

541 626

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004 年 7 月 29 日 (29.07.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/062693 A1

(51) 国際特許分類: A61K 48/00, 38/02, 31/7088, A61P 43/00, G01N 33/53, C12N 15/16

(74) 代理人: 谷川 英次郎 (TANIGAWA, Hidejiro); 〒102-0072 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号岩田ビル6階 谷川国際特許事務所内 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/016956

(22) 国際出願日: 2003 年 12 月 26 日 (26.12.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(30) 優先権データ:  
特願2003-3967 2003 年 1 月 10 日 (10.01.2003) JP

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社新潟ティーエルオー (NIIGATA TLO CORPORATION) [JP/JP]; 〒950-2181 新潟県新潟市五十嵐2の町8050番地 Niigata (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 塙 晴雄 (HANAWA, Haruo) [JP/JP]; 〒951-8104 新潟県新潟市西大畑町5214番地 西大畑職員宿舎RA205号 Niigata (JP).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: VECTOR FOR GENE THERAPY AND METHOD OF QUANTIFYING TARGET PROTEIN IN MAMMAL OR CULTURED CELLS WITH THE ADMINISTRATION OF THE VECTOR FOR GENE THERAPY

(54) 発明の名称: 遺伝子治療用ベクター及び該遺伝子治療用ベクターを投与された哺乳動物中又は培養細胞中の目的タンパク質の定量方法

(57) Abstract: A vector for gene therapy by which the concentration of a target protein in blood under the gene therapy can be monitored at an elevated sensitivity and in which a labeled peptide has no physiological effect and shows no immunogenicity in many animals. This vector for gene therapy has a structure wherein a nucleic acid encoding a fused protein of the C-terminal side 19-29 amino acid peptide region of glucagon with a target protein region to be produced *in vivo* is integrated into an expression vector for mammalian cells.

(57) 要約: 遺伝子治療を行った際の目的タンパク質の血中濃度をより高感度にモニターでき、かつ、標識ペプチドが生理作用を持たずに多くの動物で免疫原性がない、遺伝子治療用ベクターが開示されている。遺伝子治療用ベクターは、哺乳類細胞用発現ベクターに、グルカゴンのC端側19-29アミノ酸ペプチド領域と、体内で生産させるべき目的タンパク質領域との融合タンパク質をコードする核酸を組み込んだ構造を持つ。

WO 2004/062693 A1

## 明細書

遺伝子治療用ベクター及び該遺伝子治療用ベクターを投与された哺乳動物中又は培養細胞中の目的タンパク質の定量方法

## 技術分野

- 5 本発明は、生体内又は培養細胞内で生産された目的タンパク質を簡便に定量することができる、生体内で目的タンパク質を生産するための遺伝子治療用ベクターに関する。

## 背景技術

- 10 患者の体内で目的のタンパク質を生産させる遺伝子治療を行った際、目的のタンパク質の血中濃度はその蛋白の ELISA 法など、測定法が確立している場合は可能であるが、確立していない場合は濃度測定ができない。そこで、標識蛋白を用いて、その蛋白濃度を測定するアッセイ法が実用化され販売されている。しかし、この測定感度は低く、遺伝子治療における血中濃度測定として確立した方法はない。文献(Treatment of Murine Lupus with cDNA encoding IFN- $\gamma$ R/Fc, The  
15 Journal of Clinical Investigation, July 2000, volume 106, Number 2 p207-215)では目的のタンパク質を測定せずに影響を受けるタンパク質を定量化して間接的に目的のタンパク質の発現を証明している。これは血中濃度測定の難しさを示していると考えられる。

## 発明の開示

- 20 本発明の目的は、遺伝子治療を行った際の目的タンパク質の血中濃度を高感度にモニターでき、標識に起因する不所望の生理作用や抗原抗体反応がほとんど引き起こされない、遺伝子治療用ベクターを提供することである。

- 本願発明者らは、鋭意研究の結果、遺伝子治療により体内で生産させるべき目的タンパク質と、グルカゴンのC端側 19-29 アミノ酸ペプチドとの融合タンパク  
25 質をコードする核酸を組み込んだベクターで遺伝子治療を行うことにより、上記グルカゴンペプチドを標識として目的タンパク質の血中濃度を高感度に測定することができ、かつ、標識ペプチドに起因する不所望な生理作用の発現や免疫反応の誘起がほとんどないことを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、哺乳類細胞用発現ベクターに、グルカゴンのC端側19-29 アミノ酸ペプチド領域と、体内で生産させるべき目的タンパク質領域との融合タンパク質をコードする核酸を組み込んだ構造を持ち、哺乳類細胞内で前記融合タンパク質を生産させることができる遺伝子治療用ベクターを提供する。また、  
5 本発明は、上記本発明の遺伝子治療用ベクターの有効量を、前記目的タンパク質の体内又は細胞内発現が望まれる哺乳動物又は培養哺乳動物細胞に投与することを含む、遺伝子治療方法を提供する。さらに、本発明は、上記本発明の遺伝子治療用ベクターの、遺伝子治療用薬剤の製造のための使用を提供する。さらに、本発明は、上記本発明の遺伝子治療用ベクターを投与された哺乳動物又は培養哺乳動物細胞から採取された被検試料中の、グルカゴンのC端側19-29 アミノ酸ペ  
10 プチド領域を免疫測定することを含む、前記遺伝子治療用ベクターの発現により体内又は培養哺乳動物細胞内で生産された前記目的タンパク質の定量方法を提供する。さらに、本発明は、グルカゴンのC端側19-29 アミノ酸ペプチドから成る、哺乳動物体内又は培養哺乳動物細胞内において、外部から投与された発現ベ  
15 クターの発現により生産される目的タンパク質の標識剤を提供する。さらに、本発明は、哺乳動物体内又は培養哺乳動物細胞内において、外部から投与された発現ベクターの発現により生産される目的タンパク質を、標識剤としてのグルカゴンのC端側19-29 アミノ酸ペプチドとの融合タンパク質として発現させることにより、体内又は培養細胞内で生産される目的ペプチドを、グルカゴンのC端側1  
20 9-29 アミノ酸ペプチドで標識することを含む、体内又は培養細胞内で生産されるタンパク質の標識方法を提供する。さらに、本発明は、グルカゴンのC端側19-29 アミノ酸ペプチドの、哺乳動物体内又は培養哺乳動物細胞内において外部から投与された発現ベクターの発現により生産される目的タンパク質の標識剤としての使用を提供する。

25 本発明により、標識ペプチドは生理作用を持つことなく、目的タンパク質の血中濃度を高感度に測定することを可能にする遺伝子治療用ベクターが初めて提供された。グルカゴンのC端側19-29は、それ自体生理作用を有さず、各種哺乳動物においてよく保存されているので、免疫反応を実質的に誘起せず、それでい

て市販の免疫測定キットを用いて高感度に免疫測定することにより定量することが可能である。

#### 図面の簡単な説明

5 図 1 は、実施例 1 で作製した遺伝子治療用ベクターに挿入された、挿入核酸断片の塩基配列を、それがコードするアミノ酸配列と共に示す図である。

図 2 は、図 1 の続きを示す図である。

図 3 は、図 2 の続きを示す図である。

図 4 は、実施例 1 ～ 5 で用いた哺乳動物用発現ベクターである pCAGGS の遺伝子地図である。

10 図 5 は、実施例 1 における、遺伝子治療用ベクターの投与後の日数と、グルカゴン由来標識ペプチドを測定することにより測定された目的タンパク質の血中濃度との関係を示す図である。

15 図 6 は、実施例 1 において測定された、本発明のベクターを用いて遺伝子治療を行った場合の目的タンパク質の血中濃度並びに本発明のベクターを用いて遺伝子治療を行った場合及びグルカゴン由来標識ペプチドを融合していない目的タンパク質をコードする核酸を挿入したベクターを用いて遺伝子治療を行った場合の血糖値の経時変化を示す図である。

図 7 は、実施例 2 で作製した遺伝子治療用ベクターに挿入された、挿入核酸断片の塩基配列を、それがコードするアミノ酸配列と共に示す図である。

20 図 8 は、図 7 の続きを示す図である。

図 9 は、図 8 の続きを示す図である。

図 10 は、実施例 2 における、遺伝子治療用ベクターの投与後の日数と、グルカゴン由来標識ペプチドを測定することにより測定された目的タンパク質の血中濃度との関係を示す図である。

25 図 11 は、実施例 2 及び比較例 2 における、ラットの移植心臓の生着日数を示す図である。

図 12 は、実施例 3 で作製した遺伝子治療用ベクターに挿入された、挿入核酸断片の塩基配列を、それがコードするアミノ酸配列と共に示す図である。

図 1 3 は、図 1 2 の続きを示す図である。

図 1 4 は、図 1 3 の続きを示す図である。

図 1 5 は、比較例 3 で作製した遺伝子治療用ベクターに挿入された、挿入核酸断片の塩基配列を、それがコードするアミノ酸配列と共に示す図である。

5 図 1 6 は、図 1 5 の続きを示す図である。

図 1 7 は、実施例 3 における、遺伝子治療用ベクターの投与後の日数と、グルカゴン由来標識ペプチドを測定することにより測定された目的タンパク質の血中濃度との関係を示す図である。

10 図 1 8 は、実施例 3 及び比較例 3 における、ラットの心筋炎病変部位の面積率を示す図である。

図 1 9 は、実施例 4 で作製した遺伝子治療用ベクターに挿入された、挿入核酸断片の塩基配列を、それがコードするアミノ酸配列と共に示す図である。

図 2 0 は、図 1 9 の続きを示す図である。

図 2 1 は、図 2 0 の続きを示す図である。

15 図 2 2 は、実施例 4 における、遺伝子治療用ベクターの投与後の日数と、グルカゴン由来標識ペプチドを測定することにより測定された目的タンパク質の血中濃度との関係を示す図である。

図 2 3 は、実施例 4 及び比較例 4 における、ラットの心筋炎病変部位の面積率を示す図である。

20 図 2 4 は、実施例 5 で作製した遺伝子治療用ベクターに挿入された、挿入核酸断片の塩基配列を、それがコードするアミノ酸配列と共に示す図である。

図 2 5 は、実施例 5 における、グルカゴン由来標識ペプチドを測定することにより測定された目的タンパク質の血中濃度と、ヒトインターロイキン 8 を測定することにより測定された目的タンパク質の血中濃度との相関関係を示す図である。

25 発明を実施するための最良の形態

本発明のベクターにより、目的タンパク質と融合されて発現される、「グルカゴンの C 端側 19-29 アミノ酸ペプチド」とは、グルカゴンの C 末端から数えて 19 番目から 29 番目までの合計 11 個のアミノ酸から成るペプチドを意味する。

すなわち、このペプチドは、配列表の配列番号 1 に示すアミノ酸配列を有するペプチドである。この「グルカゴンの C 端側 19-29 アミノ酸ペプチド」は、目的タンパク質の標識として用いられるので、以下、便宜的に「グルカゴン由来標識ペプチド」と呼ぶことがある。

- 5      本発明のベクターには、グルカゴン由来標識ペプチド領域と、目的タンパク質領域との融合タンパク質をコードする核酸が組み込まれている。

本発明に用いられる哺乳類細胞用発現ベクターは、遺伝子治療の分野において周知であり、哺乳類細胞用発現ベクターであれば限定されない。本発明の特徴は、目的タンパク質の標識としてのグルカゴン由来標識ペプチド領域を、目的タンパク質と融合させて発現させる点にあり、哺乳類細胞用発現ベクターは、何ら限定されるものではなく、遺伝子治療の分野で用いられている公知のいずれの哺乳類細胞用発現ベクターをも用いることができる。プラスミドベクターでもウイルスベクターでもよいが、安全性の観点からプラスミドベクターが好ましい。種々の哺乳類細胞用発現ベクターが周知であり、また、市販されており、これらの周知又は市販のベクターを好ましく用いることができる。周知又は市販ベクターの例として、pCAGGS (Efficient selection for high expression transfectants with a novel eukaryotic vector, Gene 1991 Dec. 15, 108(2)p193-P199.、遺伝子地図を図 4 に、その塩基配列を配列表の配列番号 3 に示す)、プロメガ社の pCI ベクター、pSI ベクター及び pTARGET ベクター並びにインビトロジェン社の pcDNA5/T0 等を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

10  
15  
20

遺伝子治療により体内で生産させようとする目的タンパク質は、何ら限定されるものではなく、インターフェロン、インターロイキン及び CTLA4 のような種々のサイトカイン、成長因子、インスリン等のホルモン及び細胞接着因子等並びにこれらのレセプターを例示することができる。また、任意の抗原タンパク質を体内で生産させ、遺伝子ワクチンとすることもできる。また、目的タンパク質自体が融合タンパク質であってもよい。例えば、Fc レセプターとの結合が求められる所望のサイトカインの一端に、免疫グロブリン、好ましくは IgG、特に IgG1 の定常領域 (Fc) を融合し、Fc レセプターとの結合性を高めたものを目的タンパ

25

ク質とすることもできる（下記実施例 1～4 参照）。IgG の Fc 領域をコードする核酸の塩基配列は、周知であり、例えば、ヒトの IgG Fc 領域をコードする核酸の塩基配列は例えば GenBank Accession No. BC020823 等に記載されており、ラットの IgG Fc 領域をコードする核酸の塩基配列は本願の図 1 ないし図 3 等に示されている。

本発明のベクターは、目的タンパク質と、上記標識ペプチドとの融合タンパク質をコードする核酸を、哺乳類細胞用発現ベクターのクローニングサイトに挿入することにより得られる。なお、標識ペプチドは、目的タンパク質の一端、特に C 末端に融合させることが好ましい。

遺伝子治療は、本発明の遺伝子治療用ベクターを、哺乳動物に投与することにより行うことができる。投与経路は、静脈注射や筋肉内注射のような非経口投与が好ましい。ベクターの投与量は、目的タンパク質の性質や治療すべき疾患の種類及び程度等に応じて適宜設定することができるが、体重 1 kg 当りのベクターの投与量は、通常、1 mg～10 mg 程度、好ましくは 2 mg～4 mg 程度である。製剤としては、例えば、遺伝子治療用ベクターをリンゲル液に溶解した溶液を注射液として用いることができる。これに医薬製剤の分野で周知の注射剤用添加剤を添加することも可能である。あるいは、本発明の遺伝子治療用ベクターは、インビトロで培養されている哺乳動物細胞に投与することもできる。すなわち、患者のリンパ球や骨髓細胞等の細胞を体外に取り出して培養し、培養細胞に遺伝子ベクターを投与し、目的タンパク質の生産能を獲得した細胞を再び患者に戻す遺伝子治療があるが、本発明の遺伝子治療用ベクターは、このような培養哺乳動物細胞に投与することもできる。あるいは、遺伝子治療用ベクターの治療効果をインビトロで調べるため等の実験において培養される哺乳動物細胞に投与することもできる。

遺伝子治療において、体内に導入されたベクターにより上記目的タンパク質とグルカゴン由来標識ペプチドとの融合タンパク質が生産される。あるいは、インビトロで培養されている哺乳動物細胞に遺伝子治療用ベクターを投与する場合には、該培養細胞内で上記目的タンパク質とグルカゴン由来標識ペプチドとの融合

タンパク質が生産される。目的タンパク質は、標識ペプチドと融合しているので、目的タンパク質の濃度は、グルカゴン由来標識ペプチドの濃度を測定することにより測定することができる。なお、本発明で用いられるグルカゴン由来標識ペプチドを免疫測定するキット（グルカゴン由来標識ペプチドを抗原として得られる抗体を含む）が市販されている（第一ラジオアイソトープ研究所製脾グルカゴン RIA キット等）ので、このような市販の免疫測定用キットを用いて容易に測定することができる。

グルカゴン由来標識ペプチドを定量する被検試料は、本発明の遺伝子治療用ベクターを投与された個体由来の各種体液や組織等又はそれらの希釈物であり、好ましくは、全血、血清若しくは血漿又はそれらの希釈物のような血液試料である。あるいは、インビトロで培養されている哺乳動物細胞に遺伝子治療用ベクターを投与する場合には、培養細胞のホモジネートや培養上清等である。

#### 実施例 1、比較例 1

ラットのレクチンで刺激した培養脾細胞の cDNA を鋳型として用い、5'-gagaattcatttaaagttagagagcgccgcccgtgcccagaaactgtg-3' と 5'-tcaaccactgcacaaaatcttgggctttaccggagagtgggagagact-3' をプライマーとして用いて PCR を行い、さらにその PCR 産物を 300 倍希釈したものを鋳型として、5'-gagaattcatttaaagttagagagcgccgcccgtgcccagaaactgtg-3' と 5'-gagagagagaattctcaggtattcatcaaccactgcacaaaatcttgggc-3' をプライマーとして用いて PCR を行い、増幅産物を、EcoRI を用いて上記した哺乳類細胞用発現ベクター pCAGGS のクローニングサイトに組み込んだ。これにより、SwaI と NotI の制限酵素部位の入った pCAGGS-IgG-glu19-29（免疫グロブリン G1 (IgG1) の Fc 領域をコードする領域の下流に、グルカゴン由来標識ペプチドをコードする領域が結合された核酸断片が pCAGGS の EcoRI 部位に挿入されたもの）が得られた。

次に、ラット心筋炎の心臓の cDNA を鋳型として用い、5'-gagaattcatttaaagttagagagcgccgcccgtgcccagaaactgtg-3' と 5'-gcagcatcgccgcccgttcttctctgtcatcatggagaaa-3' をプライマーとして用いて PCR を行い、その PCR 産物を、先に作成した pCAGGS-IgG-glu19-29 に SwaI と NotI を用いて組み込んだ。



これにより、上記した哺乳類細胞用発現ベクターpCAGGSのEcoRI部位に、配列表の配列番号2に示す塩基配列（制限酵素部位も含めて示す）を有するDNA断片が挿入された、本発明のベクターを作製した（実施例1）。なお、配列番号2を他の情報と共に図1ないし図3に示す。図1ないし図3に示されるように、挿入した核酸断片は、両端にEcoRI部位を有し、インターフェロングammaレセプター（IFN $\gamma$ R）タンパク質と、免疫グロブリンG1（IgG1）のFc領域の融合タンパク質をコードする領域の下流に、グルカゴン由来標識ペプチドをコードする領域が結合されたもの（INF $\gamma$ R-IgG-グルカゴン<sup>19-29</sup>）である。

グルカゴン由来標識ペプチドを含まないプラスミドベクター（比較例1）と、上記のように作成したグルカゴン由来標識ペプチドを含む本発明のプラスミドベクター（実施例1）を、それぞれ7匹のラットの尾静脈から急速静脈注射し、遺伝子治療を行った。注射液の組成は、一匹あたり800 $\mu$ gのプラスミドを20mlのリンゲル液に溶解したものであった。注射後、経時的に血液を採取し、採血して得た1~10 $\mu$ lの血漿を100~1000倍希釈し、市販のRIAキット（第一ラジオアイソトープ研究所製グルカゴンRIAキット等）を用いて、該キットの添付文書に従ってグルカゴン由来標識ペプチドの濃度、ひいては、目的タンパク質（本実施例では、IFN $\gamma$ R/IgG1Fc融合タンパク質）の濃度を測定した。すなわち、RIAは、具体的には次のようにして行なった。アッセイ用緩衝液400 $\mu$ lに標準グルカゴン溶液あるいは希釈した被検血漿を200 $\mu$ l加え、さらにグルカゴン-<sup>125</sup>I溶液を100 $\mu$ l、グルカゴン抗血清溶液を100 $\mu$ l加え、4 $^{\circ}$ C、48時間放置した。その後、第二抗体を100 $\mu$ l、グルカゴンRIA用沈殿安定剤400 $\mu$ lを加え4 $^{\circ}$ C、30分間放置し、遠心分離（2000 $\times$ g 30分間、4 $^{\circ}$ C）後、上清除去後計数率を測定し濃度を求めた。

図5は血中濃度の測定結果である。実施例1では、静脈注射後1日目2870 $\pm$ 1062ng/ml（平均 $\pm$ 標準偏差）、3日目1440 $\pm$ 334ng/ml、7日目1120 $\pm$ 433ng/ml、16日目281 $\pm$ 162ng/ml、との結果が得られ、全例で測定可能であった。一方、グルカゴンペプチドを含まないプラスミドベクターでの遺伝子治療（比較例1）では同様な検査ですべて感度以下であった。

図6はプラスミド静脈注射4, 8, 12時間後の血糖値及び上記と同様にRIA測定法で検査した蛋白血中濃度の値である。実施例1では、血中濃度は4時間後  $2815 \pm 2318 \text{ ng/ml}$ 、8時間後  $6061 \pm 2789 \text{ ng/ml}$ 、12時間後  $5752 \pm 2270 \text{ ng/ml}$  を示し、最大血中濃度を示した8-12時間後の血糖は、8時間後  $89.3 \pm 15.1 \text{ mg/dl}$  (実施例1) vs  $81.8 \pm 7.5 \text{ mg/dl}$  (比較例1)、12時間後  $63.5 \pm 5.7 \text{ mg/dl}$  (実施例1) vs  $71.4 \pm 6.9 \text{ mg/dl}$  (比較例1) と差はなかった。

以上の結果から、本発明のベクターを用いることにより、ベクター投与の数十日後まで、極少量の血漿サンプルから、目的タンパク質の血中濃度を十分測定することが可能であることが明らかになった。

#### 実施例2、比較例2

ラットのレクチンで刺激した培養脾細胞のcDNAを鋳型として用い、5'-gagaat tcatttaaattggcttgtcttggactccagagg-3'と5'-gcagcatcgcgccgcgtctgaatctgggcat gggttctgg -3'をプライマーとして用いてPCRを行い、そのPCR産物を、実施例1記載の方法で作製したpCAGGS-IgG-glu19-29にSwaIとNotIを用いて組み込んだ。

これにより、図7ないし9及び配列番号4に示す塩基配列(制限酵素部位も含めて示す)を有するラットCTLA4-IgG-グルカゴン<sup>19-29</sup>(ラットCTLA4コード領域の下流にラットIgG Fcコード領域、その下流にグルカゴン由来標識ペプチドコード領域を結合した核酸断片)が上記した哺乳類細胞用発現ベクターpCAGGSのEcoRI部位に挿入された、ラット細胞内でCTLA4-IgG-グルカゴン<sup>19-29</sup>を発現する組換えベクターが作製された(実施例2)。比較のため、CTLA4コード領域を含まないIgG-グルカゴン<sup>19-29</sup>コード領域のみを挿入した組換えベクターも作製した(比較例2)。

心臓移植後のラットに、実施例1と同様にして組換えベクターを投与し、血中濃度を測定した。また、移植心臓の生着日数も調べた。

結果を図10及び図11に示す。図10に示されるように、実施例2では、CTLA4-IgG-グルカゴン<sup>19-29</sup>蛋白が図7のように推移した。つまり前値は100倍希釈ではグルカゴンが測定不能であったが、1日目に急激に上昇し、 $5000 \text{ ng/ml}$ を越えるような蛋白濃度を示し、その後徐々に低下したが、評価のため屠殺した105

日後まで、1000ng/ml を越えるような蛋白濃度を示した。また、図 1 1 に示されるように、実施例 2 では、10 匹中 1 匹が 14 日目に拒絶されたが、残りの 9 匹はすべて評価した 105 日まで生着していた。CTLA4 を含まない pCAGGS-SP-IgG-グルカゴン<sup>19-29</sup> で治療した群（比較例 2）では、5 匹中 1 匹が 5 日目に、1 匹が 6 日目に、3 匹が 7 日目に拒絶された。これは有意に pCAGGS-CTLA4-IgG-グルカゴン<sup>19-29</sup> 治療の有効性を示している。

### 実施例 3、比較例 3

ラットのレクチンで刺激した培養脾細胞の cDNA を鋳型として用い、5'-gagaat tcatttaaattggcactctgggtgactgcagtc-3' と 5'-gcagcatcgcgccgcgtggccatagcggaaa agttgctt-3' をプライマーとして用いて PCR を行い、その PCR 産物を実施例 1 記載の方法で作製した pCAGGS-IgG-glu19-29 に SmaI と NotI を用いて組み込んだ。

これにより、図 1 2 ないし 1 4 及び配列番号 5 に示す塩基配列（制限酵素部位も含めて示す）を有するラット IL13-IgG-グルカゴン<sup>19-29</sup>（ラットインターロイキン 13 (IL13) コード領域の下流にラット IgG Fc コード領域、その下流にグルカゴン由来標識ペプチドコード領域を結合した核酸断片）が上記した哺乳類細胞用発現ベクター pCAGGS の Eco RI 部位に挿入された、ラット細胞内で IL13-IgG-グルカゴン<sup>19-29</sup> を発現する組換えベクターが作製された（実施例 3）。比較のため、IL13 コード領域を含まない SP-IgG-グルカゴン<sup>19-29</sup> コード領域（配列番号 6 並びに図 1 5 及び図 1 6）のみを挿入した組換えベクターも作製した（比較例 3）。

自己免疫性心筋炎ラット（A novel experimental model of giant cell myocarditis induced in rats by immunization with cardiac myosin fraction. Clinical Immunology and Immunopathology, November 1990, volume 57, p250-262.）のラットに、実施例 1 と同様にして組換えベクターを投与し、血中濃度を測定した。また、投与 16 日後に屠殺、解剖し、心筋炎病変部位の病変面積率も調べた。

結果を図 1 7 及び図 1 8 に示す。IL13-IgG-グルカゴン<sup>19-29</sup> 蛋白が図 1 7 のように推移した。つまり、1 日目に 2000ng/ml を越えるような蛋白濃度を示し、そ

の後徐々に低下したが、評価のため屠殺した 16 日後まで、約 8ng/ml の蛋白濃度を示した。また、図 1 8 に示すように、本発明の遺伝子治療用ベクターである pCAGGS-IL13-IgG-グルカゴン<sup>19-29</sup> (IL13-IgG-グルカゴン<sup>19-29</sup> を挿入したベクター-pCAGGS) を投与した群では、IL13 を含まない pCAGGS-SP-IgG-グルカゴン<sup>19-29</sup> を投与した群に比べて、有意に心筋炎病変部位の面積が小さく、pCAGGS-IL13-IgG-グルカゴン<sup>19-29</sup> 治療の有効性が示された。

#### 実施例 4、比較例 4

マウスのレクチンで刺激した培養脾細胞の cDNA を鋳型として用い、5'-gagaat tcatttaaattggaaatctgctggggaccctac-3' と 5'-gcagcatcgccgcttggtcttcctggaag tagaactt-3' をプライマーとして用いて PCR を行い、その PCR 産物を実施例 1 記載の方法で作製した pCAGGS-IgG-glu19-29 に SmaI と NotI を用いて組み込んだ。

これにより、図 1 9 ないし 2 1 及び配列番号 7 に示す塩基配列 (制限酵素部位も含めて示す) を有するラット IL1RA-IgG-グルカゴン<sup>19-29</sup> (ラットインターロイキン 1 レセプターアンタゴニストコード領域の下流にラット IgG Fc コード領域、その下流にグルカゴン由来標識ペプチドコード領域を結合した核酸断片) が上記した哺乳類細胞用発現ベクター-pCAGGS の Eco RI 部位に挿入された、ラット細胞内で IL1RA-IgG-グルカゴン<sup>19-29</sup> を発現する組換えベクターが作製された (実施例 4)。

自己免疫性心筋炎ラット (A novel experimental model of giant cell myocarditis induced in rats by immunization with cardiac myosin fraction. Clinical Immunology and Immunopathology, November 1990, volume 57, p250-262.) のラットに、実施例 1 と同様にして組換えベクターを投与し、血中濃度を測定した。また、投与 16 日後に屠殺、解剖し、心筋炎病変部位の病変面積率も調べた。比較のため、上記比較例 3 のベクターも投与した (比較例 4)。

結果を図 2 2 及び図 2 3 に示す。図 2 2 に示すように、実施例 4 では、IL1RA-IgG-グルカゴン<sup>19-29</sup> 蛋白が図 2 2 のように推移した。つまり、1 日目に 2000ng/ml を越えるような蛋白濃度を示し、その後徐々に低下したが、評価のため屠殺した 16 日後まで、約 20ng/ml の蛋白濃度を示した。また、図 2 3 に示すように、

実施例 4 では比較例 4 に比べて、有意に心筋炎病変部位の面積が小さく、pCAGGS-IL1RA-IgG-グルカゴン<sup>19-29</sup> 治療の有効性が示された。

#### 実施例 5

Swal と NotI の制限酵素部位の入った pCAGGS-glu19-29 を作るために、5'-gag  
5 aattcattttaaatgagagcggccgccccgggtaaagcccaagattttgtgcagtggttg-3' と 5'-gagag  
agagaattctcaggtattcatcaaccactgcacaaaatcttgggc-3' のプライマーのみで PCR を  
行い、EcoRI を用いて、pCAGGS のクローニングサイトに組み込んだ。

次に Cos7 細胞の cDNA を鋳型として用い、5'-gagaattcattttaaatgacttccaagctg  
gccgtggct-3' と 5'-gcagcatcgcgccgctgaattctcagccctcttcaaaaa-3' をプライマー  
10 として用いて PCR を行い、その PCR 産物を、先に作成した pCAGGS-glu19-29 に S  
wal と NotI を用いて組み込んだ。

これにより、図 2 4 及び配列番号 8 に示す塩基配列を有するヒト IL8-グルカ  
ゴン<sup>19-29</sup> (ヒトインターロイキン 8 コード領域の下流にグルカゴン由来標識ペ  
プチドコード領域を結合した核酸断片) が上記した哺乳類細胞用発現ベクター pC  
15 AGGS の Eco RI 部位に挿入された、ラット細胞内で IL8-グルカゴン<sup>19-29</sup> を発現  
する組換えベクターが作製された (実施例 5)。

ラットに、実施例 1 と同様にして組換えベクターを投与し、1 日後に採血し、  
血中濃度を測定した。また、同じ試料中のヒト IL-8 の濃度も定量した。ヒト I  
L-8 の定量は、BIOSOURCE 社製 (Nivelles, Belgium)、IL-8 EASIA キットを用  
20 いてそのプロトコールに従って行った。

結果を図 2 5 に示す。図 2 5 に示すごとく、両者のモル濃度はほぼ一致し、グ  
ルカゴン<sup>19-29</sup> の標識ペプチドを用いた方法の正確性が証明された。

## 請求の範囲

1. 哺乳類細胞用発現ベクターに、グルカゴンのC端側 19-29 アミノ酸ペプチド領域と、体内で生産させるべき目的タンパク質領域との融合タンパク質をコードする核酸を組み込んだ構造を持ち、哺乳類細胞内で前記融合タンパク質を生産  
5 させることができる遺伝子治療用ベクター。
2. 前記グルカゴンのC端側 19-29 アミノ酸ペプチド領域は、前記目的タンパク質領域のC末端に結合される請求項 1 記載のベクター。
3. 前記目的タンパク質が、サイトカイン若しくはサイトカインに免疫グロブリンの定常領域を付加した融合タンパク質、成長因子、ホルモン若しくは細胞接  
10 着因子又はこれらのレセプターである請求項 1 又は 2 記載のベクター。
4. 前記サイトカイン又はそのレセプターが、インターフェロン及びそのレセプター、CTLA4、インターロイキン及びそのレセプターから成る群から選ばれる請求項 3 記載のベクター。
5. 請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の遺伝子治療用ベクターの有効量  
15 を、前記目的タンパク質の体内又は培養哺乳動物細胞内発現が望まれる哺乳動物又は培養哺乳動物細胞に投与することを含む、遺伝子治療方法。
6. 前記遺伝子治療用ベクターを、哺乳動物に投与する請求項 5 記載の方法。
7. 請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の遺伝子治療用ベクターの、遺伝子治療用薬剤の製造のための使用。
8. 請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の遺伝子治療用ベクターを投与  
20 された哺乳動物又は培養哺乳動物細胞から採取された被検試料中の、グルカゴンのC端側 19-29 アミノ酸ペプチド領域を免疫測定することを含む、前記遺伝子治療用ベクターの発現により体内又は培養細胞内で生産された前記目的タンパク質の定量方法。
9. 前記被検試料が、前記遺伝子治療用ベクターを投与された哺乳動物から採  
25 取されたものである請求項 8 記載の方法。
10. 前記被検試料が、血液試料である請求項 9 記載の方法。
11. グルカゴンのC端側 19-29 アミノ酸ペプチドから成る、哺乳動物体内

又は培養哺乳動物細胞において、外部から投与された発現ベクターの発現により生産される目的タンパク質の標識剤。

12. グルカゴンのC端側19-29アミノ酸ペプチドから成る、哺乳動物体内において、外部から投与された発現ベクターの発現により生産される目的タンパク質の標識剤。

13. 哺乳動物体内又は培養哺乳動物細胞内において、外部から投与された発現ベクターの発現により生産される目的タンパク質を、標識剤としてのグルカゴンのC端側19-29アミノ酸ペプチドとの融合タンパク質として発現させることにより、体内又は培養細胞内で生産される目的ペプチドを、グルカゴンのC端側19-29アミノ酸ペプチドで標識することを含む、体内又は培養細胞内で生産されるタンパク質の標識方法。

14. 哺乳動物体内において、外部から投与された発現ベクターの発現により生産される目的タンパク質を、標識剤としてのグルカゴンのC端側19-29アミノ酸ペプチドとの融合タンパク質として発現させることにより、体内で生産される目的ペプチドを、グルカゴンのC端側19-29アミノ酸ペプチドで標識することを含む、請求項13記載の方法。

15. グルカゴンのC端側19-29アミノ酸ペプチドの、哺乳動物体内又は培養哺乳動物細胞において外部から投与された発現ベクターの発現により生産される目的タンパク質の標識剤としての使用。

16. グルカゴンのC端側19-29アミノ酸ペプチドの、哺乳動物体内において外部から投与された発現ベクターの発現により生産される目的タンパク質の標識剤としての使用。

File Name : IFN-rR-IgG-glu19-29

Range : 1 - 1470 Mode : Normal

Codon Table : Universal

EcoRI      SmaI ←      IFN $\gamma$  R

```

5'   9      18      27      36      45      54
    GAA TTC ATT TAA ATG ATT CTG CTG GTG GTC CTG ATG CTG TCT GCG GAG ATC GGG
    ---
      M   I   L   L   V   V   L   M   L   S   A   E   I   G

      63      72      81      90      99     108
    AGT GGA GCT TTG ATG AGC ACC GAG GAT CCT AAG CCG CCC TCG GTG CCT GCG CCA
    ---
      S   G   A   L   M   S   T   E   D   P   K   P   P   S   V   P   A   P

      117     126     135     144     153     162
    ACA AAT GTT CTA ATT ACG TCC TAT GAC TTG AAC CCT GTC GTA CAT TGG AAG CAC
    ---
      T   N   V   L   I   T   S   Y   D   L   N   P   V   V   H   W   K   H

      171     180     189     198     207     216
    CAG AAC GTG TCG CAG GCT GCC GTC TTC ACT GTA CAG GTA AAG ATG TAT CCA GAA
    ---
      Q   N   V   S   Q   A   A   V   F   T   V   Q   V   K   M   Y   P   E

      225     234     243     252     261     270
    TAC TGG ACT GAT GCC TGC ACC AAC ATT GCC CAT CAT TAT TGT AAT ATC TAC AAA
    ---
      Y   W   T   D   A   C   T   N   I   A   H   H   Y   C   N   I   Y   K

      279     288     297     306     315     324
    CAC ATT TCC TAT CCT GAC TCA TCT GCC TGG GCC AGA GTT AAG GCC AAG GTT GGA
    ---
      H   I   S   Y   P   D   S   S   A   W   A   R   V   K   A   K   V   G

      333     342     351     360     369     378
    CAA AGA GAA TCT GCC TAT GCG CAG TCA GAA GAG TTT ATT ATG TGC CGA AAG GGG
    ---
      Q   R   E   S   A   Y   A   Q   S   E   E   F   I   M   C   R   K   G

      387     396     405     414     423     432
    AAG GTT GGA CCG CCT GGC CTG GAC ATC GGA AGG AAG GAA GAT CAG CTG ATT GTC
    ---
      K   V   G   P   P   G   L   D   I   G   R   K   E   D   Q   L   I   V

      441     450     459     468     477     486
    CAC ATA TTT CAC CCT AAG GTC AAT GTG AGT CAG GAA ACC ATG TTT GGT GAC GGA
    ---
      H   I   F   H   P   K   V   N   V   S   Q   E   T   M   F   G   D   G

      495     504     513     522     531     540
    AAT ACC TGT TAC ACA TTC GAC TAC ACT GTG TTT GTG AAA CAT TAC AGG AGT GGG
    ---
      N   T   C   Y   T   F   D   Y   T   V   F   V   K   H   Y   R   S   G
  
```



549			558			567			576			585			594		
GAG	ATC	CTA	CAT	ACA	GAA	CAT	AGC	GTC	CTA	AAA	GAA	GAT	TGT	AGC	GAA	ACT	CTG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
E	I	L	H	T	E	H	S	V	L	K	E	D	C	S	E	T	L
603			612			621			630			639			648		
TGT	GAG	TTA	AAC	ATC	TCA	GTG	TCC	ACG	CTG	AAT	TCC	AAT	TAC	TGT	GTT	TCA	GTA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
C	E	L	N	I	S	V	S	T	L	N	S	N	Y	C	V	S	V
657			666			675			684			693			702		
GTT	GGA	AAG	TCG	TCT	TTC	TGG	CAA	GTT	AAT	ACA	GAA	ACA	TCA	AAA	GAC	GCC	TGT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
V	G	K	S	S	F	W	Q	V	N	T	E	T	S	K	D	A	C
<p style="text-align: center;">IFN    <math>\gamma</math> R    <math>\rightarrow</math>                      NotI    <math>\leftarrow</math>    IgG</p>																	
711			720			729			738			747			756		
ATC	CCC	TTT	CTC	CAT	GAT	GAC	AGA	GAA	GAA	GCG	GCC	GCC	GTG	CCC	AGA	AAC	TGT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
I	P	F	L	H	D	D	R	E	E	A	A	A	V	P	R	N	C
765			774			783			792			801			810		
GGA	GGT	GAT	TGC	AAG	CCT	TGT	ATA	TGT	ACA	GGC	TCA	GAA	GTA	TCA	TCT	GTC	TTC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G	G	D	C	K	P	C	I	C	T	G	S	E	V	S	S	V	F
819			828			837			846			855			864		
ATC	TTC	CCC	CCA	AAG	CCC	AAA	GAT	GTG	CTC	ACC	ATC	ACT	CTG	ACT	CCT	AAG	GTC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
I	F	P	P	K	P	K	D	V	L	T	I	T	L	T	P	K	V
873			882			891			900			909			918		
ACG	TGT	GTT	GTG	GTA	GAC	ATT	AGC	CAG	GAC	GAT	CCC	GAG	GTC	CAT	TTC	AGC	TGG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
T	C	V	V	V	D	I	S	Q	D	D	P	E	V	H	F	S	W
927			936			945			954			963			972		
TTT	GTA	GAT	GAC	GTG	GAA	GTC	CAC	ACA	GCT	CAG	ACT	CGA	CCA	CCA	GAG	GAG	CAG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
F	V	D	D	V	E	V	H	T	A	Q	T	R	P	P	E	E	Q
981			990			999			1008			1017			1026		
TTC	AAC	AGC	ACT	TTC	CGC	TCA	GTC	AGT	GAA	CTC	CCC	ATC	CTG	CAC	CAG	GAC	TGG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
F	N	S	T	F	R	S	V	S	E	L	P	I	L	H	Q	D	W
1035			1044			1053			1062			1071			1080		
CTC	AAT	GGC	AGG	ACG	TTC	AGA	TGC	AAG	GTC	ACC	AGT	GCA	GCT	TTC	CCA	TCC	CCC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
L	N	G	R	T	F	R	C	K	V	T	S	A	A	F	P	S	P

1089	1098	1107	1116	1125	1134
ATC GAG AAA ACC	ATC TCC AAA CCC	GAA GGC AGA ACA	CAA GTT CCG CAT	GTA TAC	
---	---	---	---	---	---
I E K T	I S K P	E G R T	Q V P H	V Y	

1143	1152	1161	1170	1179	1188
ACC ATG TCA CCT	ACC AAG GAA GAG	ATG ACC CAG AAT	GAA GTC AGT	ATC ACC TGC	
---	---	---	---	---	---
T M S P	T K E E	M T Q N	E V S I	T C	

1197	1206	1215	1224	1233	1242
ATG GTA AAA GGC	TTC TAT CCC CCA	GAC ATT TAT GTG	GAG TGG CAG	ATG AAC GGG	
---	---	---	---	---	---
M V K G	F Y P P	D I Y V	E W Q M	N G	

1251	1260	1269	1278	1287	1296
CAG CCA CAG GAA	AAC TAC AAG AAC	ACT CCA CCT	ACG ATG GAC	ACA GAT GGG	AGT
---	---	---	---	---	---
Q P Q E	N Y K N	T P P T	M D T D	G S	

1305	1314	1323	1332	1341	1350
TAC TTC CTC TAC	AGC AAG CTC AAT	GTG AAG AAG	GAA AAA TGG	CAG CAG GGA	AAC
---	---	---	---	---	---
Y F L Y	S K L N	V K K E	K W Q Q	G N	

1359	1368	1377	1386	1395	1404
ACG TTC ACG TGT	TCT GTG CTG CAT	GAA GGC CTG CAC	AAC CAC CAT	ACT GAG AAG	
---	---	---	---	---	---
T F T C	S V L H	E G L H	N H H T	E K	

IgG      → ← glucagon 19-29

1413	1422	1431	1440	1449	1458
AGT CTC TCC CAC	TCT CCG GGT AAA	GCC CAA GAT TTT	GTG CAG TGG TTG	ATG AAT	
---	---	---	---	---	---
S L S H	S P G K	A Q D F	V Q W L	M N	

→ EcoRI

1467
ACC TGA GAA TTC 3'
---
T *

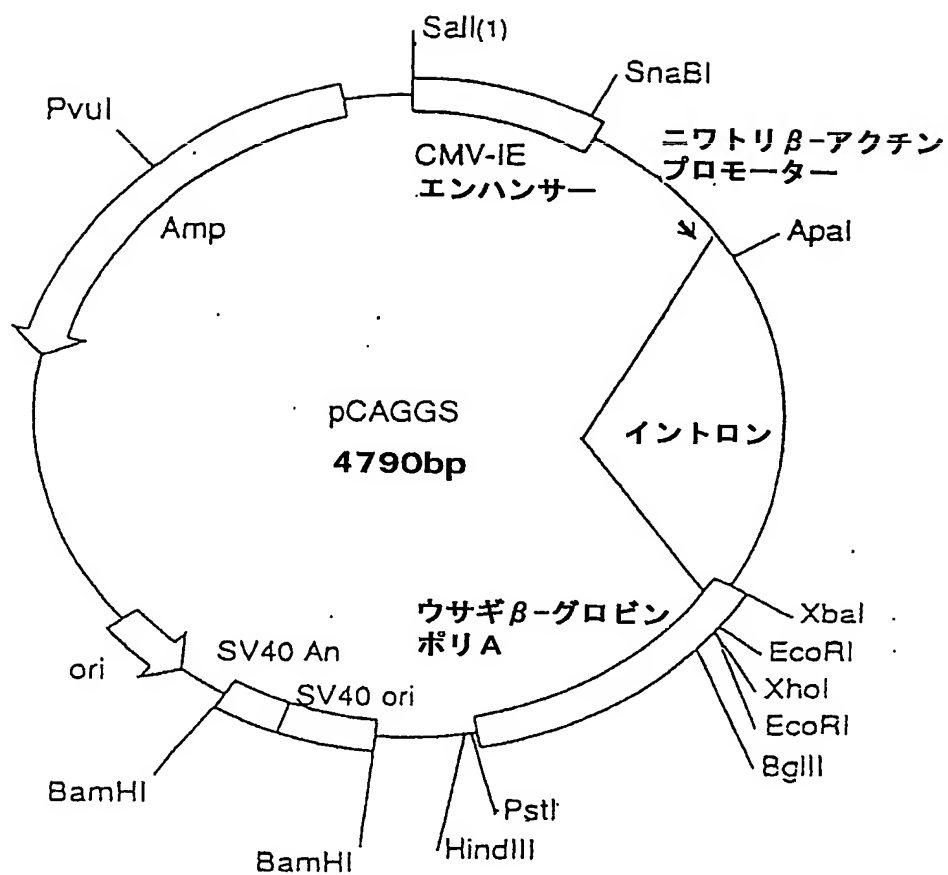


図 4

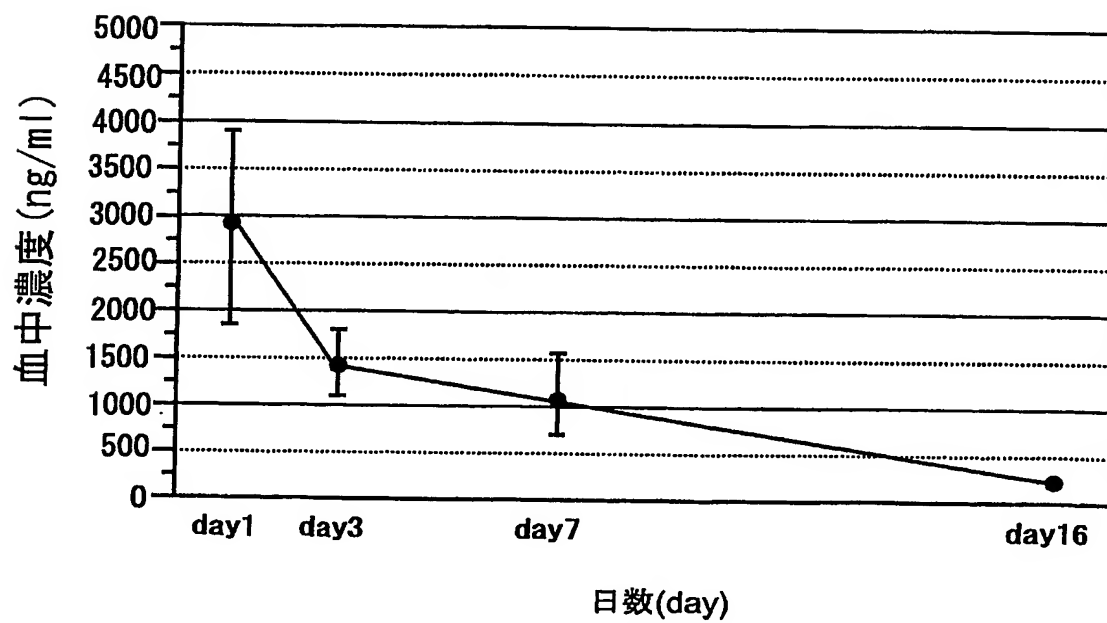


図 5

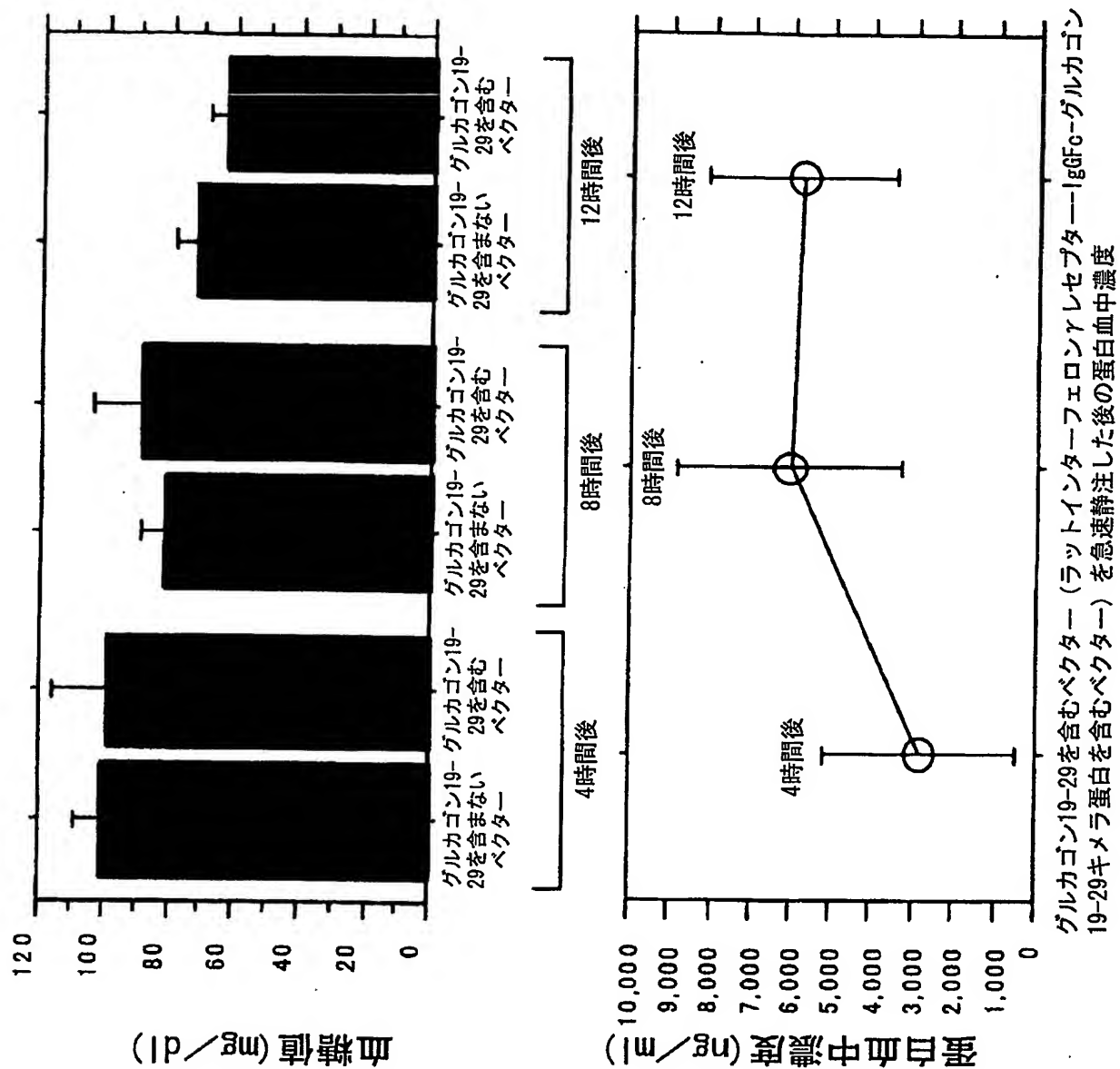


図6

File Name : CTLA4-IgG- glu19-29  
 Range : 1 - 1233 Mode : Normal  
 Codon Table : Universal

EcoRI      SmaI ← CTLA4

```

      9      18      27      36      45      54
5' GAA TTC ATT TAA ATG GCT TGT CTT GGA CTC CAG AGG TAC AAA ACT CAC CTG CAG
   ---
           M  A  C  L  G  L  Q  R  Y  K  T  H  L  Q

      63      72      81      90      99      108
CTG CCT TCT AGG ACT TGG CCT TTT GGA GTC CTG CTT TCT CTT CTC TTC ATC CCA
   ---
   L  P  S  R  T  W  P  F  G  V  L  L  S  L  L  F  I  P

      117      126      135      144      153      162
ATC TTC TCT GAA GCC ATA CAA GTG ACC CAA CCT TCA GTG GTG TTG GCC AGC AGC
   ---
   I  F  S  E  A  I  Q  V  T  Q  P  S  V  V  L  A  S  S

      171      180      189      198      207      216
CAC GGT GTC GCC AGC TTT CCA TGT GAA TAT GCA TCT TCA CAC AAC ACT GAT GAG
   ---
   H  G  V  A  S  F  P  C  E  Y  A  S  S  H  N  T  D  E

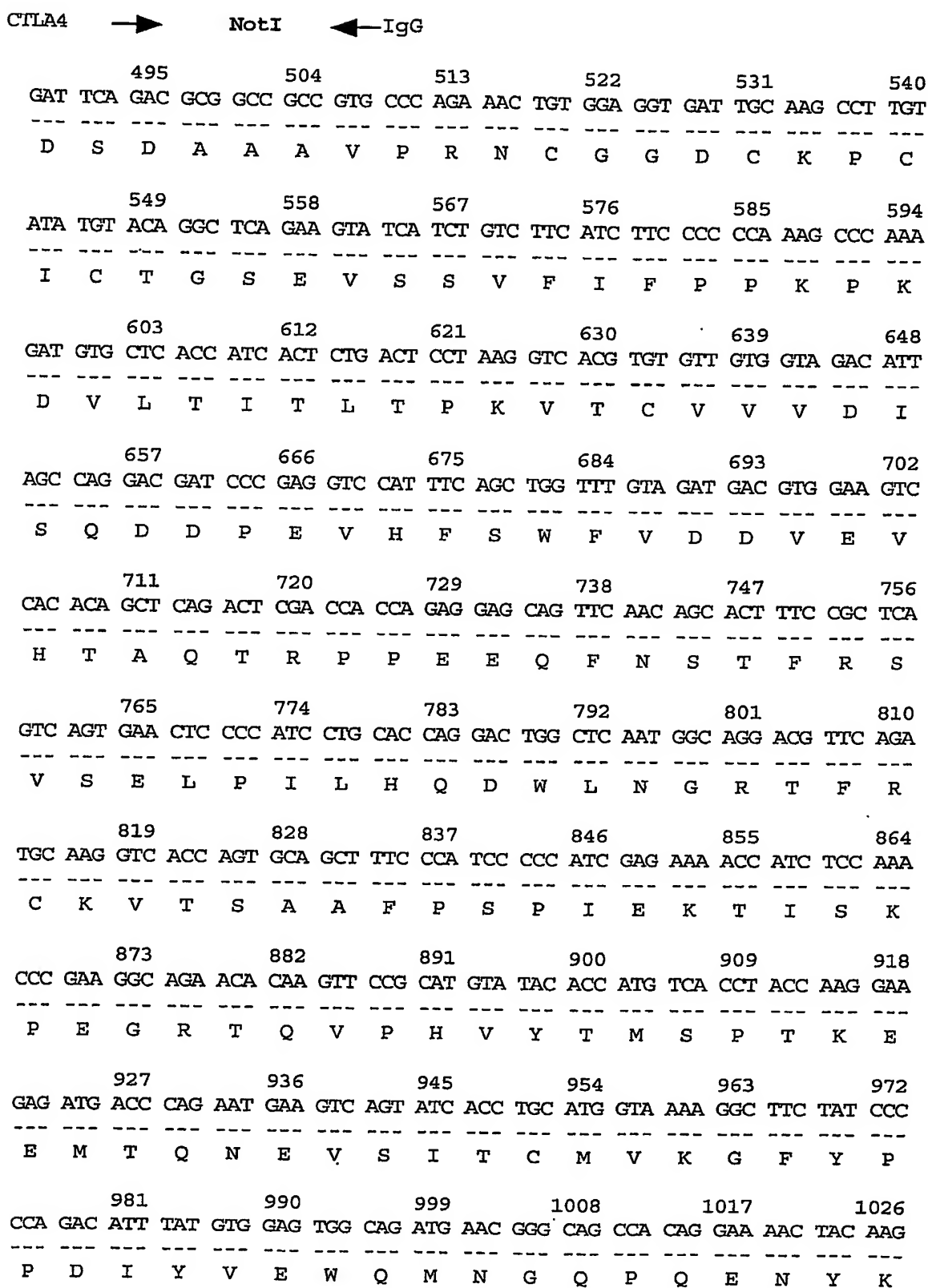
      225      234      243      252      261      270
GTC CGG GTG ACG GTG CTG CGG CAG ACA AAT GAC CAA GTG ACA GAG GTC TGT GCC
   ---
   V  R  V  T  V  L  R  Q  T  N  D  Q  V  T  E  V  C  A

      279      288      297      306      315      324
ACG ACA TTC ACA GTG AAG AAC ACG TTG GGC TTC CTA GAT GAC CCC TTC TGC AGT
   ---
   T  T  F  T  V  K  N  T  L  G  F  L  D  D  P  F  C  S

      333      342      351      360      369      378
GGT ACC TTT AAT GAA AGC AGA GTG AAC CTC ACC ATC CAA GGA CTG AGG GCT GCT
   ---
   G  T  F  N  E  S  R  V  N  L  T  I  Q  G  L  R  A  A

      387      396      405      414      423      432
GAC ACC GGA CTG TAC TTC TGC AAG GTG GAA CTC ATG TAC CCA CCG CCA TAC TTT
   ---
   D  T  G  L  Y  F  C  K  V  E  L  M  Y  P  P  P  Y  F

      441      450      459      468      477      486
GTG GGC ATG GGC AAC GGG ACC CAG ATT TAT GTC ATC GAT CCA GAA CCA TGC CCA
   ---
   V  G  M  G  N  G  T  Q  I  Y  V  I  D  P  E  P  C  P
  
```



		1035			1044			1053			1062			1071			1080	
AAC	ACT	CCA	CCT	ACG	ATG	GAC	ACA	GAT	GGG	AGT	TAC	TTC	CTC	TAC	AGC	AAG	CTC	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
N	T	P	P	T	M	D	T	D	G	S	Y	F	L	Y	S	K	L	
		1089			1098			1107			1116			1125			1134	
AAT	GTG	AAG	AAG	GAA	AAA	TGG	CAG	CAG	GGA	AAC	ACG	TTC	ACG	TGT	TCT	GTG	CTG	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
N	V	K	K	E	K	W	Q	Q	G	N	T	F	T	C	S	V	L	
																	IgG	
		1143			1152			1161			1170			1179			1188	
CAT	GAA	GGC	CTG	CAC	AAC	CAC	CAT	ACT	GAG	AAG	AGT	CTC	TCC	CAC	TCT	CCG	GGT	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
H	E	G	L	H	N	H	H	T	E	K	S	L	S	H	S	P	G	
→	←	glucagon 19-29										→	EcoRI					
		1197			1206			1215			1224			1233				
AAA	GCC	CAA	GAT	TTT	GTG	CAG	TGG	TTG	ATG	AAT	ACC	TGA	GAA	TTC	3'			
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---				
K	A	Q	D	F	V	Q	W	L	M	N	T	*						

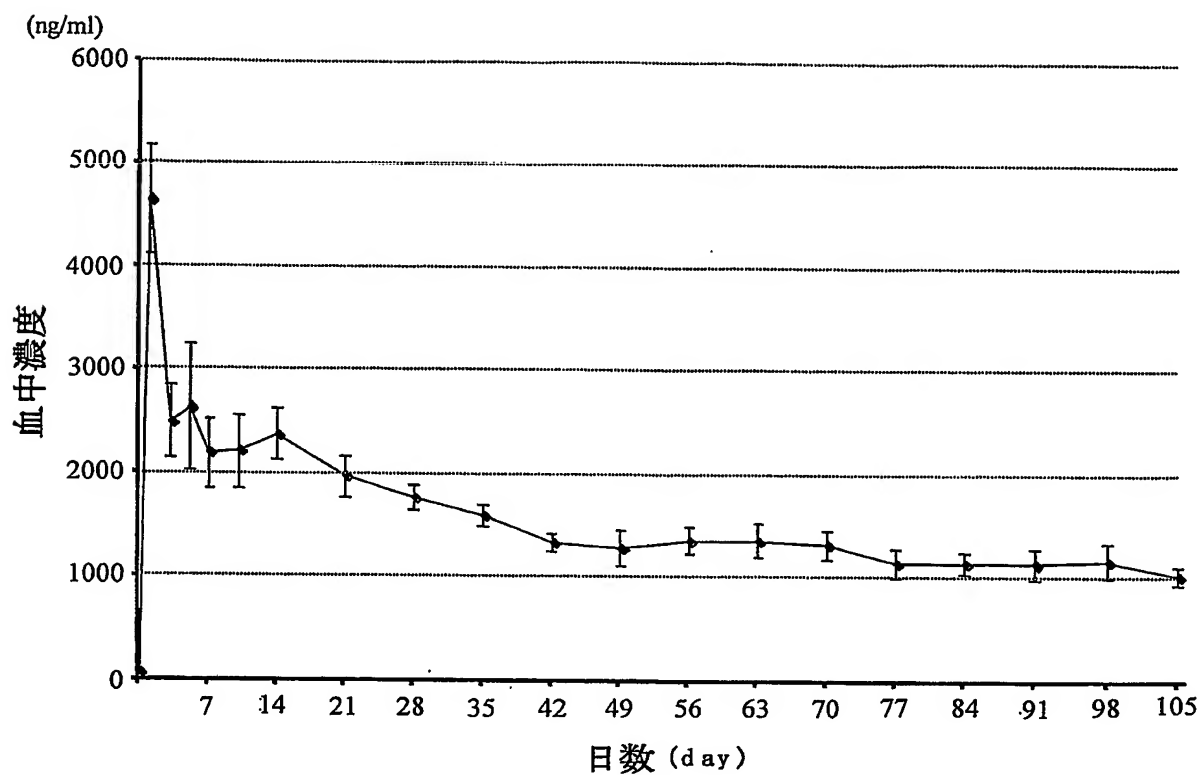


図 10

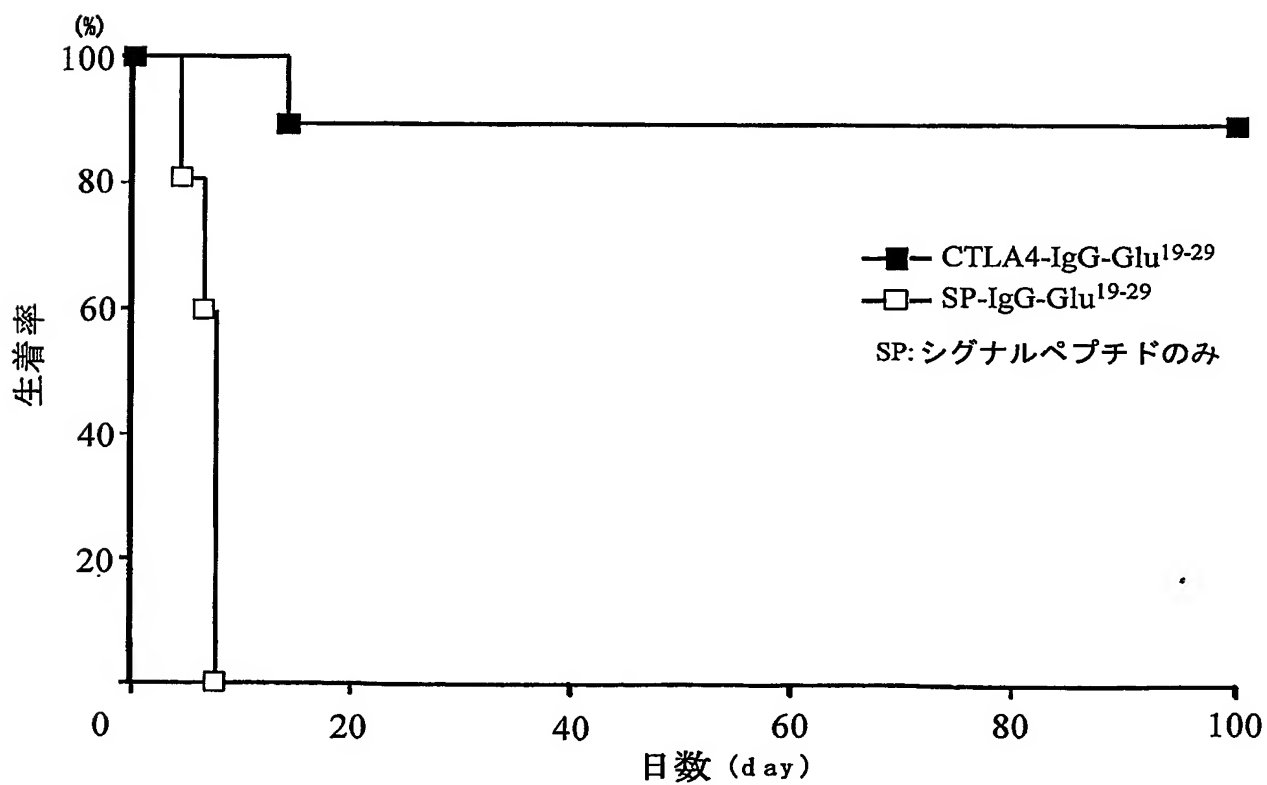


図 11



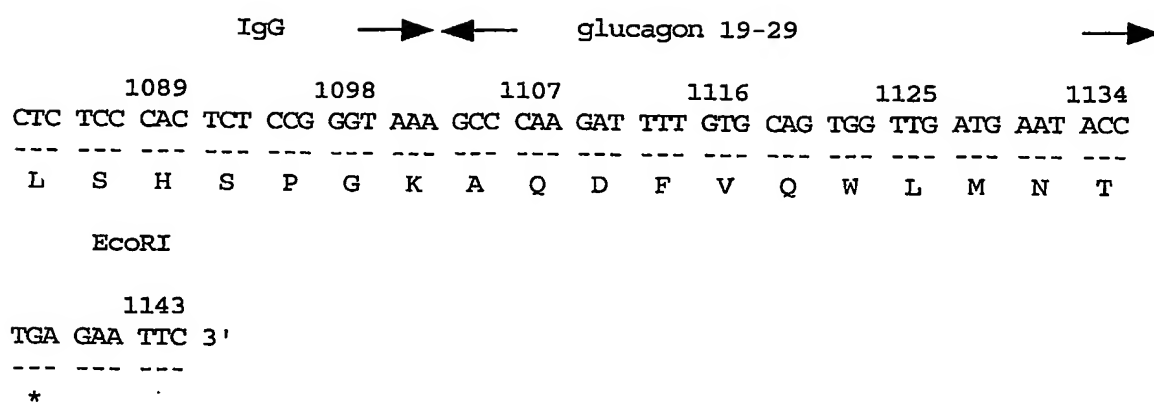
File Name : IL13-IgG-glu19-29

Range : 1 - 1143 Mode : Normal

Codon Table : Universal

	EcoRI				SwaI ←				IL-13															
5'	9				18				27				36				45				54			
	GAA	TTC	ATT	TAA	ATG	GCA	CTC	TGG	GTG	ACT	GCA	GTC	CTG	GCT	CTC	GCT	TGC	CTT						
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		
					M	A	L	W	V	T	A	V	L	A	L	A	C	L						
	63				72				81				90				99				108			
	GGT	GGT	CTT	GCC	ACC	CCA	GGG	CCA	GTG	CGG	AGA	TCC	ACA	TCT	CCC	CCT	GTG	GCC						
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		
	G	G	L	A	T	P	G	P	V	R	R	S	T	S	P	P	V	A						
	117				126				135				144				153				162			
	CTC	AGG	GAG	CTT	ATC	GAG	GAG	CTG	AGC	AAC	ATC	ACA	CAA	GAC	CAG	AAG	ACT	TCC						
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		
	L	R	E	L	I	E	E	L	S	N	I	T	Q	D	Q	K	T	S						
	171				180				189				198				207				216			
	CTG	TGC	AAC	AGC	AGC	ATG	GTA	TGG	AGC	GTG	GAC	CTG	ACA	GCT	GGC	GGG	TTC	TGT						
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		
	L	C	N	S	S	M	V	W	S	V	D	L	T	A	G	G	F	C						
	225				234				243				252				261				270			
	GCA	GCC	CTG	GAA	TCC	CTG	ACC	AAC	ATC	TCC	AGT	TGC	AAT	GCC	ATC	CAC	AGG	ACC						
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		
	A	A	L	E	S	L	T	N	I	S	S	C	N	A	I	H	R	T						
	279				288				297				306				315				324			
	CAG	AGG	ATA	TTG	AAT	GGC	CTC	TGT	AAC	CAA	AAG	GCC	TCG	GAT	GTG	GCT	TCC	AGC						
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		
	Q	R	I	L	N	G	L	C	N	Q	K	A	S	D	V	A	S	S						
	333				342				351				360				369				378			
	CCC	CCA	GAT	ACC	AAA	ATC	GAA	GTA	GCC	CAG	TTT	ATA	TCA	AAA	CTG	CTC	AAT	TAC						
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		
	P	P	D	T	K	I	E	V	A	Q	F	I	S	K	L	L	N	Y						
	IL-13 → NotI ← IgG																							
	387				396				405				414				423				432			
	TCC	AAG	CAA	CTT	TTC	CGC	TAT	GGC	CAC	GCG	GCC	GCC	GTG	CCC	AGA	AAC	TGT	GGA						
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		
	S	K	Q	L	F	R	Y	G	H	A	A	A	V	P	R	N	C	G						
	441				450				459				468				477				486			
	GGT	GAT	TGC	AAG	CCT	TGT	ATA	TGT	ACA	GGC	TCA	GAA	GTA	TCA	TCT	GTC	TTC	ATC						
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		
	G	D	C	K	P	C	I	C	T	G	S	E	V	S	S	V	F	I						

TTC	CCC	495	CCA	AAG	CCC	504	AAA	GAT	GTG	513	CTC	ACC	ATC	522	ACT	CTG	ACT	531	CCT	AAG	GTC	540	ACG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
F	P	P	K	P	K	D	V	L	T	I	T	L	T	P	K	V	T						
		549	GTG	GTA	GAC	558	ATT	AGC	CAG	567	GAC	GAT	CCC	576	GAG	GTC	CAT	585	TTC	AGC	TGG	594	TTT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
C	V	V	V	D	I	S	Q	D	D	P	E	V	H	F	S	W	F						
		603	GAT	GAC	GTG	GAA	GTC	CAC	ACA	621	GCT	CAG	ACT	630	CGA	CCA	CCA	639	GAG	GAG	CAG	648	TTC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
V	D	D	V	E	V	H	T	A	Q	T	R	P	P	E	E	Q	F						
		657	AGC	ACT	TTC	CGC	TCA	GTC	AGT	675	GAA	CTC	CCC	684	ATC	CTG	CAC	693	CAG	GAC	TGG	702	CTC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
N	S	T	F	R	S	V	S	E	L	P	I	L	H	Q	D	W	L						
		711	GGC	AGG	ACG	TTC	AGA	TGC	AAG	729	GTC	ACC	AGT	738	GCA	GCT	TTC	747	CCA	TCC	CCC	756	ATC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
N	G	R	T	F	R	C	K	V	T	S	A	A	F	P	S	P	I						
		765	AAA	ACC	ATC	TCC	AAA	CCC	GAA	783	GGC	AGA	ACA	792	CAA	GTT	CCG	801	CAT	GTA	TAC	810	ACC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
E	K	T	I	S	K	P	E	G	R	T	Q	V	P	H	V	Y	T						
		819	TCA	CCT	ACC	AAG	GAA	GAG	ATG	837	ACC	CAG	AAT	846	GAA	GTC	AGT	855	ATC	ACC	TGC	864	ATG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
M	S	P	T	K	E	E	M	T	Q	N	E	V	S	I	T	C	M						
		873	AAA	GGC	TTC	TAT	CCC	CCA	GAC	891	ATT	TAT	GTG	900	GAG	TGG	CAG	909	ATG	AAC	GGG	918	CAG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
V	K	G	F	Y	P	P	D	I	Y	V	E	W	Q	M	N	G	Q						
		927	CAG	GAA	AAC	TAC	AAG	AAC	ACT	945	CCA	CCT	ACG	954	ATG	GAC	ACA	963	GAT	GGG	AGT	972	TAC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P	Q	E	N	Y	K	N	T	P	P	T	M	D	T	D	G	S	Y						
		981	CTC	TAC	AGC	AAG	CTC	AAT	GTG	999	AAG	AAG	GAA	1008	AAA	TGG	CAG	1017	CAG	GGA	AAC	1026	ACG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
F	L	Y	S	K	L	N	V	K	K	E	K	W	Q	Q	G	N	T						
		1035	ACG	TGT	TCT	GTG	CTG	CAT	GAA	1053	GGC	CTG	CAC	1062	AAC	CAC	CAT	1071	ACT	GAG	AAG	1080	AGT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
F	T	C	S	V	L	H	E	G	L	H	N	H	H	T	E	K	S						



File Name : SP-IgG-glu-19-29

Range : 1 - 825 Mode : Normal

Codon Table : Universal

	EcoRI			SwaI			Signal peptide of SLPI												
5'	9			18			27			36			45			54			
	GAA	TTC	ATT	TAA	ATG	AAG	TCC	TGC	GGC	CTG	TTC	CCT	CTC	ATG	GTG	CTC	CTT	GCT	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
					M	K	S	C	G	L	F	P	L	M	V	L	L	A	
	Signal peptide of SLPI												NotI		IgG				
	63			72			81			90			99			108			
	CTG	GGT	GTA	CTG	GCA	CCC	TGG	AGT	GTG	GAA	GGA	GCG	GCC	GCC	GTG	CCC	AGA	AAC	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
	L	G	V	L	A	P	W	S	V	E	G	A	A	A	V	P	R	N	
	117			126			135			144			153			162			
	TGT	GGA	GGT	GAT	TGC	AAG	CCT	TGT	ATA	TGT	ACA	GGC	TCA	GAA	GTA	TCA	TCT	GTC	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
	C	G	G	D	C	K	P	C	I	C	T	G	S	E	V	S	S	V	
	171			180			189			198			207			216			
	TTC	ATC	TTC	CCC	CCA	AAG	CCC	AAA	GAT	GTG	CTC	ACC	ATC	ACT	CTG	ACT	CCT	AAG	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
	F	I	F	P	P	K	P	K	D	V	L	T	I	T	L	T	P	K	
	225			234			243			252			261			270			
	GTC	ACG	TGT	GTT	GTG	GTA	GAC	ATT	AGC	CAG	GAC	GAT	CCC	GAG	GTC	CAT	TTC	AGC	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
	V	T	C	V	V	V	D	I	S	Q	D	D	P	E	V	H	F	S	
	279			288			297			306			315			324			
	TGG	TTT	GTA	GAT	GAC	GTG	GAA	GTC	CAC	ACA	GCT	CAG	ACT	CGA	CCA	CCA	GAG	GAG	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
	W	F	V	D	D	V	E	V	H	T	A	Q	T	R	P	P	E	E	
	333			342			351			360			369			378			
	CAG	TTC	AAC	AGC	ACT	TTC	CGC	TCA	GTC	AGT	GAA	CTC	CCC	ATC	CTG	CAC	CAG	GAC	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
	Q	F	N	S	T	F	R	S	V	S	E	L	P	I	L	H	Q	D	
	387			396			405			414			423			432			
	TGG	CTC	AAT	GGC	AGG	ACG	TTC	AGA	TGC	AAG	GTC	ACC	AGT	GCA	GCT	TTC	CCA	TCC	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
	W	L	N	G	R	T	F	R	C	K	V	T	S	A	A	F	P	S	
	441			450			459			468			477			486			
	CCC	ATC	GAG	AAA	ACC	ATC	TCC	AAA	CCC	GAA	GGC	AGA	ACA	CAA	GTT	CCG	CAT	GTA	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
	P	I	E	K	T	I	S	K	P	E	G	R	T	Q	V	P	H	V	



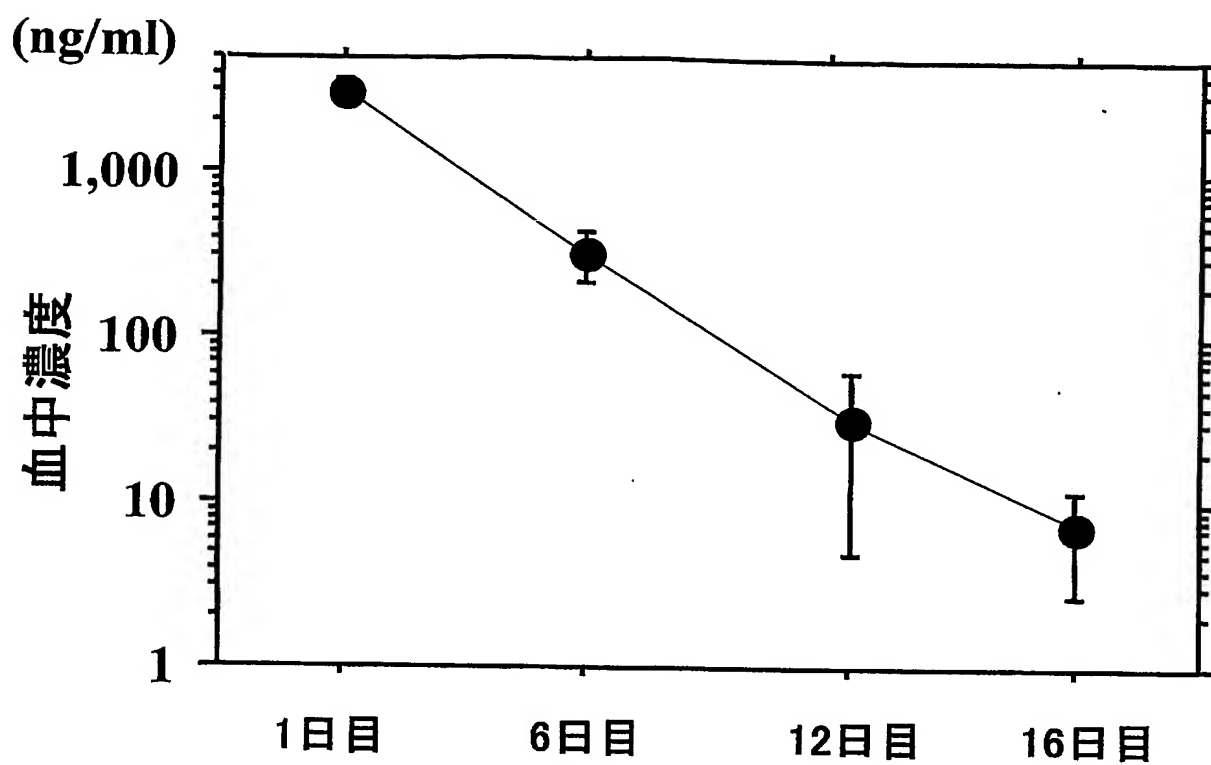


図 17

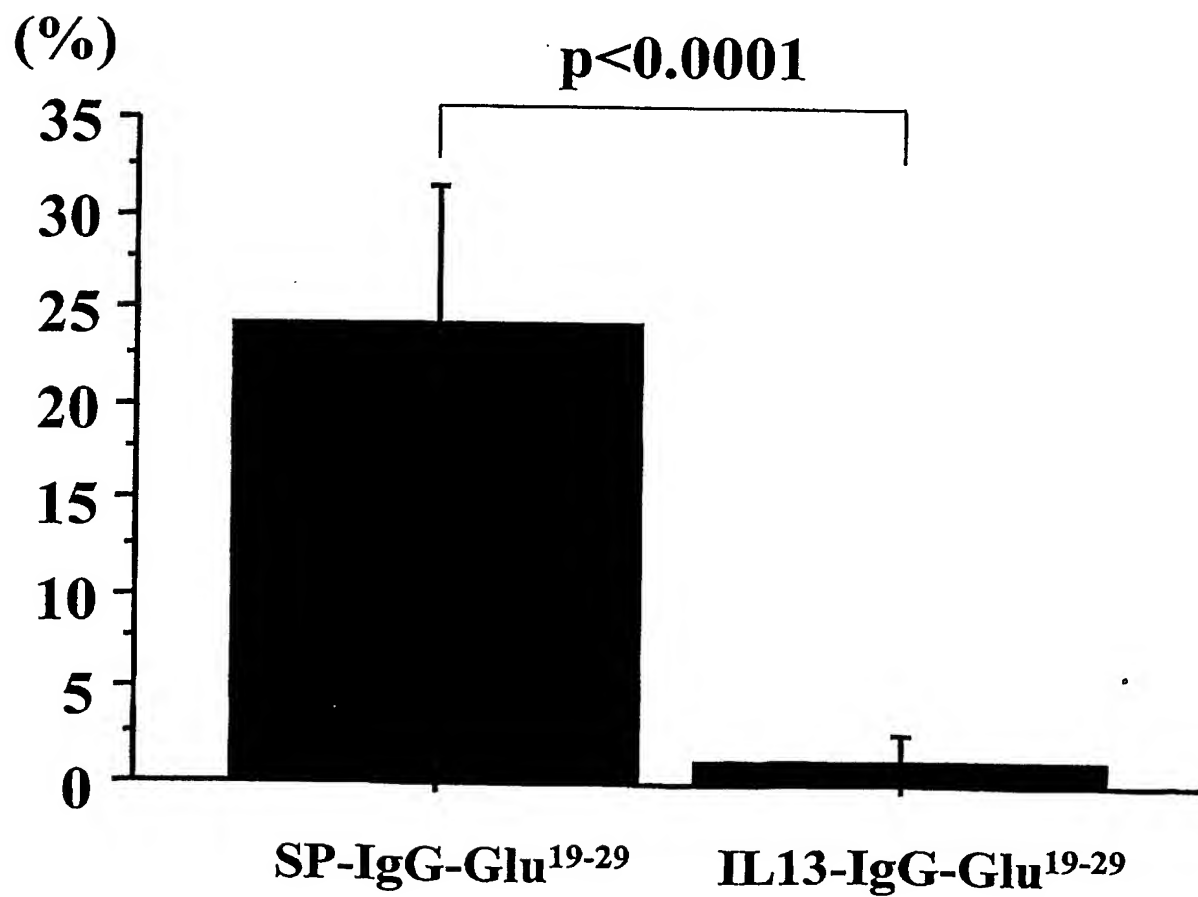


図 18

File Name : IL1RA-IgG-glu19-29

Range : 1 - 1284 Mode : Normal

Codon Table : Universal

EcoRI      SmaI ←      IL-1RA

```

      9      18      27      36      45      54
5' GAA TTC ATT TAA ATG GAA ATC TGC TGG GGA CCC TAC AGT CAC CTA ATC TCT CTC
   ---
       M   E   I   C   W   G   P   Y   S   H   L   I   S   L

      63      72      81      90      99      108
CCT CTC ATC CTT CTG TTT CAT TCA GAG GCA GCC TGC CGC CCT TCT GGG AAA AGA
   ---
   L   L   I   L   L   F   H   S   E   A   A   C   R   P   S   G   K   R

     117      126      135      144      153      162
CCC TGC AAG ATG CAA GCC TTC AGA ATC TGG GAT ACT AAC CAG AAG ACC TTT TAC
   ---
   P   C   K   M   Q   A   F   R   I   W   D   T   N   Q   K   T   F   Y

     171      180      189      198      207      216
CTG AGA AAC AAC CAG CTC ATT GCT GGG TAC TTA CAA GGA CCA AAT ATC AAA CTA
   ---
   L   R   N   N   Q   L   I   A   G   Y   L   Q   G   P   N   I   K   L

     225      234      243      252      261      270
GAA GAA AAG ATA GAC ATG GTG CCT ATT GAC CTT CAT AGT GTG TTC TTG GGC ATC
   ---
   E   E   K   I   D   M   V   P   I   D   L   H   S   V   F   L   G   I

     279      288      297      306      315      324
CAC GGG GGC AAG CTG TGC CTG TCT TGT GCC AAG TCT GGA GAT GAT ATC AAG CTC
   ---
   H   G   G   K   L   C   L   S   C   A   K   S   G   D   D   I   K   L

     333      342      351      360      369      378
CAG CTG GAG GAA GTT AAC ATC ACT GAT CTG AGC AAG AAC AAA GAA GAA GAC AAG
   ---
   Q   L   E   E   V   N   I   T   D   L   S   K   N   K   E   E   D   K

     387      396      405      414      423      432
CGC TTT ACC TTC ATC CGC TCT GAG AAA GGC CCC ACC ACC AGC TTT GAG TCA GCT
   ---
   R   F   T   F   I   R   S   E   K   G   P   T   T   S   F   E   S   A

     441      450      459      468      477      486
GCC TGT CCA GGA TGG TTC CTC TGC ACA ACA CTA GAG GCT GAC CGT CCT GTG AGC
   ---
   A   C   P   G   W   F   L   C   T   T   L   E   A   D   R   P   V   S

```

## IL-1RA

CTC	ACC	AAC	ACA	CCG	GAA	GAG	CCC	CTT	ATA	GTC	ACG	AAG	TTC	TAC	TTC	CAG	GAA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
L	T	N	T	P	E	E	P	L	I	V	T	K	F	Y	F	Q	E

→ NotI ← IgG

GAC	CAA	GCG	GCC	GCC	GTG	CCC	AGA	AAC	TGT	GGA	GGT	GAT	TGC	AAG	CCT	TGT	ATA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
D	Q	A	A	A	V	P	R	N	C	G	G	D	C	K	P	C	I

TGT	ACA	GGC	TCA	GAA	GTA	TCA	TCT	GTC	TTC	ATC	TTC	CCC	CCA	AAG	CCC	AAA	GAT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
C	T	G	S	E	V	S	S	V	F	I	F	P	P	K	P	K	D

GTG	CTC	ACC	ATC	ACT	CTG	ACT	CCT	AAG	GTC	ACG	TGT	GTT	GTG	GTA	GAC	ATT	AGC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
V	L	T	I	T	L	T	P	K	V	T	C	V	V	V	D	I	S

CAG	GAC	GAT	CCC	GAG	GTC	CAT	TTC	AGC	TGG	TTT	GTA	GAT	GAC	GTG	GAA	GTC	CAC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Q	D	D	P	E	V	H	F	S	W	F	V	D	D	V	E	V	H

ACA	GCT	CAG	ACT	CGA	CCA	CCA	GAG	GAG	CAG	TTC	AAC	AGC	ACT	TTC	CGC	TCA	GTC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
T	A	Q	T	R	P	P	E	E	Q	F	N	S	T	F	R	S	V

AGT	GAA	CTC	CCC	ATC	CTG	CAC	CAG	GAC	TGG	CTC	AAT	GGC	AGG	ACG	TTC	AGA	TGC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
S	E	L	P	I	L	H	Q	D	W	L	N	G	R	T	F	R	C

AAG	GTC	ACC	AGT	GCA	GCT	TTC	CCA	TCC	CCC	ATC	GAG	AAA	ACC	ATC	TCC	AAA	CCC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
K	V	T	S	A	A	F	P	S	P	I	E	K	T	I	S	K	P

GAA	GGC	AGA	ACA	CAA	GTT	CCG	CAT	GTA	TAC	ACC	ATG	TCA	CCT	ACC	AAG	GAA	GAG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
E	G	R	T	Q	V	P	H	V	Y	T	M	S	P	T	K	E	E

ATG	ACC	CAG	AAT	GAA	GTC	AGT	ATC	ACC	TGC	ATG	GTA	AAA	GGC	TTC	TAT	CCC	CCA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
M	T	Q	N	E	V	S	I	T	C	M	V	K	G	F	Y	P	P





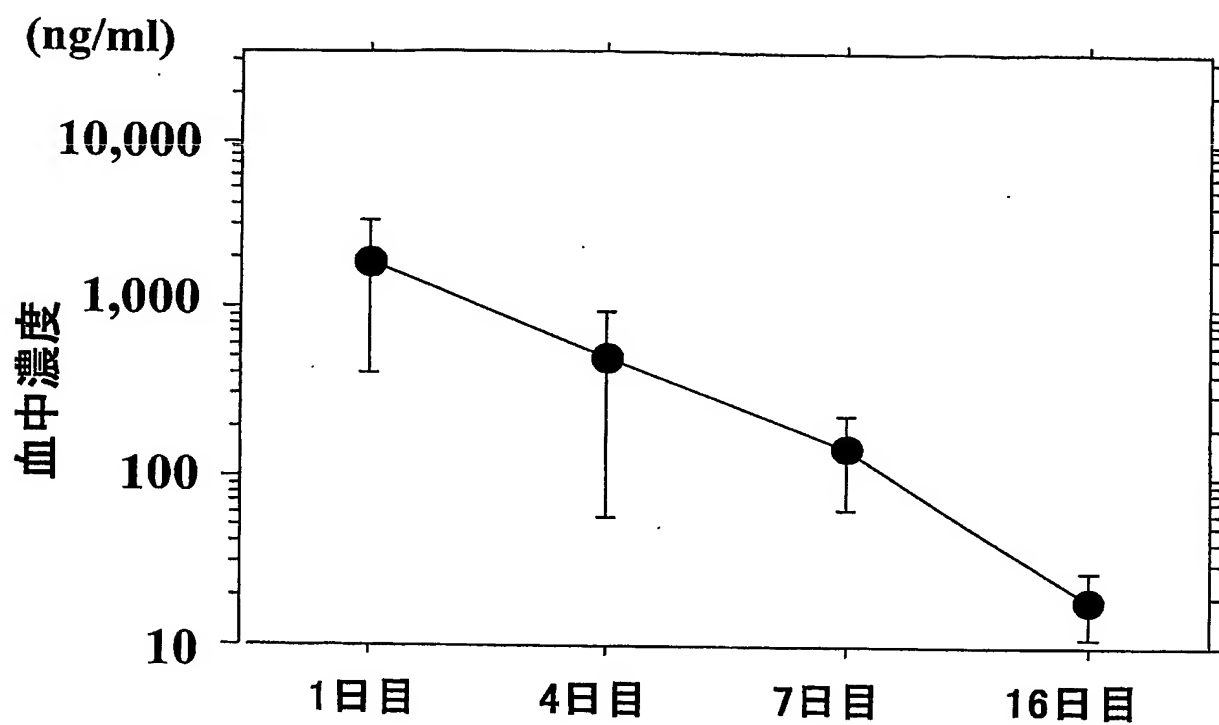


図 2 2

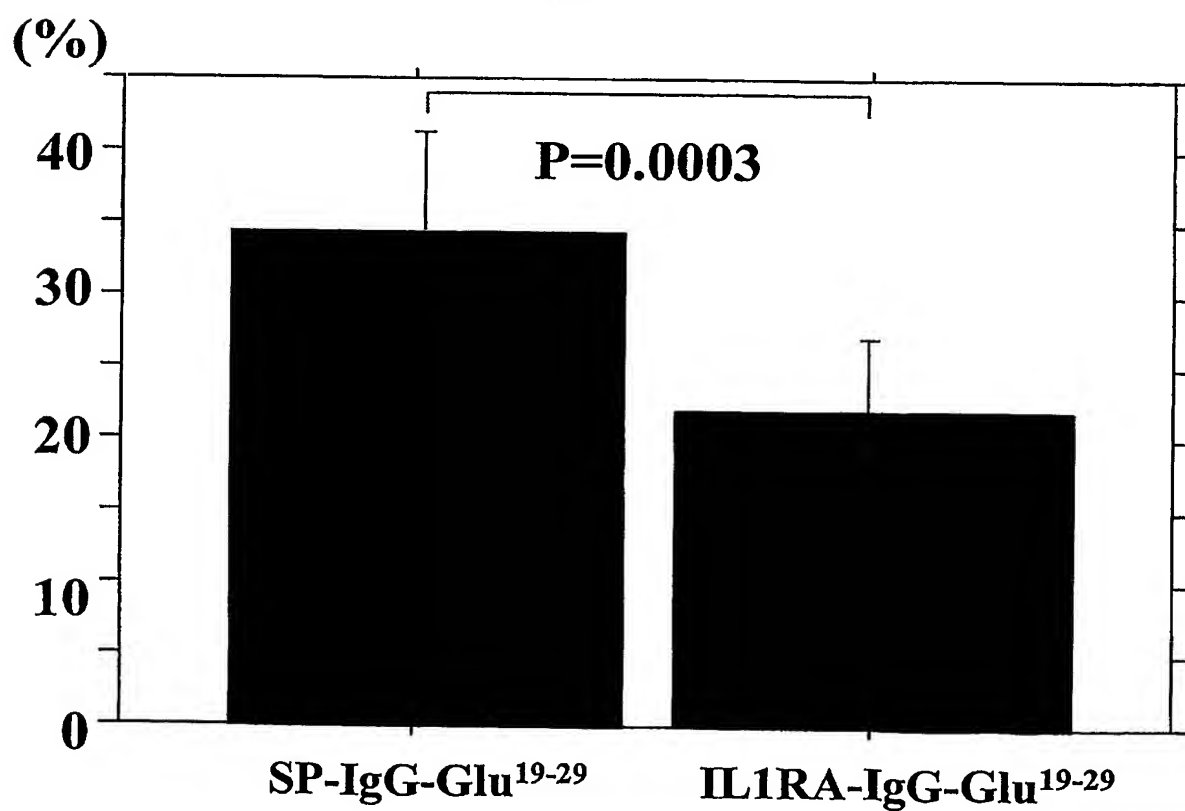
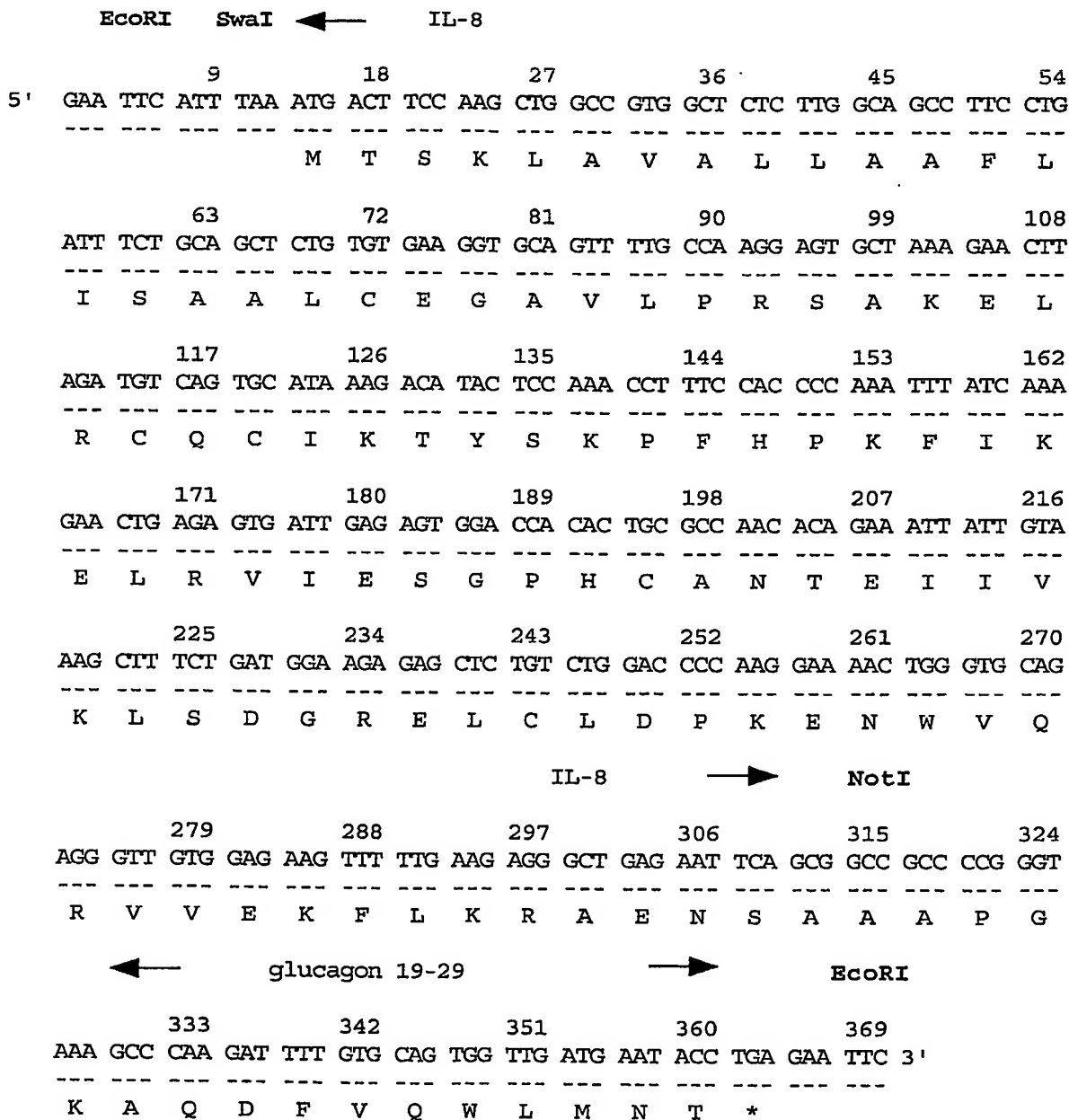


図 2 3

File Name : IL8-glu 19-29

Range : 1 - 369 Mode : Normal

Codon Table : Universal



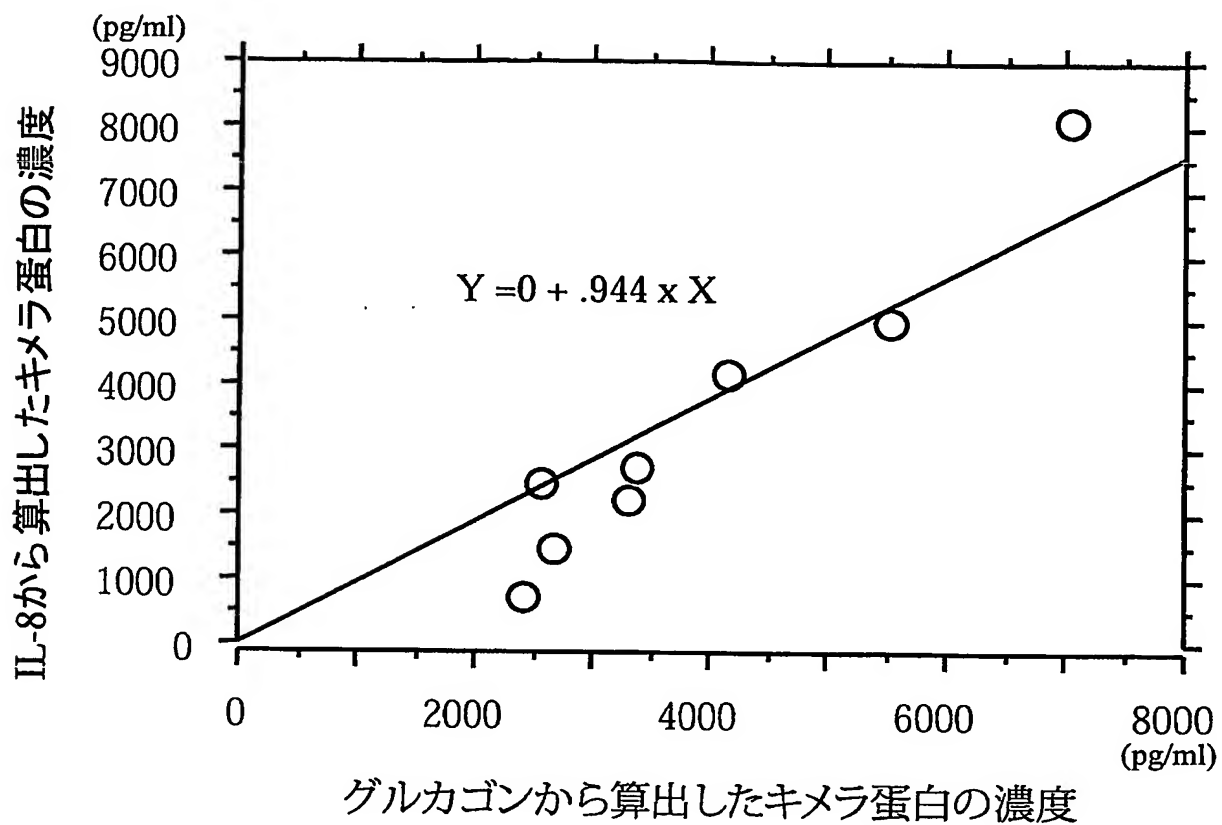


図 2 5

## SEQUENCE LISTING

<110> NIIGATA TLO CORPORATION

<120> Vector for gene therapy and method for quantifying target protein in mammal or cultured cell to which the vector for gene therapy was administered

<130> 03PF275-PCT

<150> JP 2003-3967

<151> 2003-01-10

<160> 24

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligopeptide encoding C19-29 region of glucagon of human, mouse or rat

<400> 1

Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr

1

5

10

<210> 2

<211> 1471

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (13).. (1461)

<223> DNA insert encoding rat IFN- $\gamma$  receptor, rat IgG Fc region and glucagon C19-29 region

&lt;400&gt; 2

gaattcattt aa atg att ctg ctg gtg gtc ctg atg ctg tct gog gag atc 51

Met Ile Leu Leu Val Val Leu Met Leu Ser Ala Glu Ile

1

5

10

ggg agt gga gct ttg atg agc acc gag gat cct aag ccg ccc tcg gtg 99

Gly Ser Gly Ala Leu Met Ser Thr Glu Asp Pro Lys Pro Pro Ser Val

15

20

25

cct gcg oca aca aat gtt cta att acg toc tat gac ttg aac cct gtc 147

Pro Ala Pro Thr Asn Val Leu Ile Thr Ser Tyr Asp Leu Asn Pro Val

30

35

40

45

gta cat tgg aag cac cag aac gtg tcg cag gct gcc gtc ttc act gta 195

Val His Trp Lys His Gln Asn Val Ser Gln Ala Ala Val Phe Thr Val

50

55

60

cag gta aag atg tat cca gaa tac tgg act gat gcc tgc acc aac att 243

Gln Val Lys Met Tyr Pro Glu Tyr Trp Thr Asp Ala Cys Thr Asn Ile

65

70

75

gcc cat cat tat tgt aat atc tac aaa cac att toc tat cct gac tca 291

Ala His His Tyr Cys Asn Ile Tyr Lys His Ile Ser Tyr Pro Asp Ser

80

85

90

tct gcc tgg gcc aga gtt aag gcc aag gtt gga caa aga gaa tct gcc 339

Ser Ala Trp Ala Arg Val Lys Ala Lys Val Gly Gln Arg Glu Ser Ala

95

100

105

tat gcg cag tca gaa gag ttt att atg tgc cga aag ggg aag gtt gga 387

Tyr Ala Gln Ser Glu Glu Phe Ile Met Cys Arg Lys Gly Lys Val Gly

110

115

120

125

ccg cct ggc ctg gac atc gga agg aag gaa gat cag ctg att gtc cac 435

Pro Pro Gly Leu Asp Ile Gly Arg Lys Glu Asp Gln Leu Ile Val His

130	135	140	
ata ttt cac cct aag gtc aat gtg agt cag gaa acc atg ttt ggt gac			483
Ile Phe His Pro Lys Val Asn Val Ser Gln Glu Thr Met Phe Gly Asp			
145	150	155	
gga aat acc tgt tac aca ttc gac tac act gtg ttt gtg aaa cat tac			531
Gly Asn Thr Cys Tyr Thr Phe Asp Tyr Thr Val Phe Val Lys His Tyr			
160	165	170	
agg agt ggg gag atc cta cat aca gaa cat agc gtc cta aaa gaa gat			579
Arg Ser Gly Glu Ile Leu His Thr Glu His Ser Val Leu Lys Glu Asp			
175	180	185	
tgt agc gaa act ctg tgt gag tta aac atc tca gtg tcc acg ctg aat			627
Cys Ser Glu Thr Leu Cys Glu Leu Asn Ile Ser Val Ser Thr Leu Asn			
190	195	200	205
tcc aat tac tgt gtt tca gta gtt gga aag tcg tct ttc tgg caa gtt			675
Ser Asn Tyr Cys Val Ser Val Val Gly Lys Ser Ser Phe Trp Gln Val			
210	215	220	
aat aca gaa aca tca aaa gac gcc tgt atc ccc ttt ctc cat gat gac			723
Asn Thr Glu Thr Ser Lys Asp Ala Cys Ile Pro Phe Leu His Asp Asp			
225	230	235	
aga gaa gaa gcg gcc gcc gtg ccc aga aac tgt gga ggt gat tgc aag			771
Arg Glu Glu Ala Ala Ala Val Pro Arg Asn Cys Gly Gly Asp Cys Lys			
240	245	250	
cct tgt ata tgt aca ggc tca gaa gta tca tct gtc ttc atc ttc ccc			819
Pro Cys Ile Cys Thr Gly Ser Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro			
255	260	265	
cca aag ccc aaa gat gtg ctc acc atc act ctg act cct aag gtc acg			867
Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr			

270	275	280	285	
tgt gtt gtg gta gac att agc cag gac gat ccc gag gtc cat ttc agc				915
Cys Val Val Val Asp Ile Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val His Phe Ser				
290	295	300		
tgg ttt gta gat gac gtg gaa gtc cac aca gct cag act cga cca cca				963
Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Arg Pro Pro				
305	310	315		
gag gag cag ttc aac agc act ttc cgc tca gtc agt gaa ctc ccc atc				1011
Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile				
320	325	330		
ctg cac cag gac tgg ctc aat ggc agg acg ttc aga tgc aag gtc acc				1059
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Arg Thr Phe Arg Cys Lys Val Thr				
335	340	345		
agt gca got ttc cca tcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa ccc gaa				1107
Ser Ala Ala Phe Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Pro Glu				
350	355	360	365	
ggc aga aca caa gtt ccg cat gta tac acc atg tca cct acc aag gaa				1155
Gly Arg Thr Gln Val Pro His Val Tyr Thr Met Ser Pro Thr Lys Glu				
370	375	380		
gag atg acc cag aat gaa gtc agt atc acc tgc atg gta aaa ggc ttc				1203
Glu Met Thr Gln Asn Glu Val Ser Ile Thr Cys Met Val Lys Gly Phe				
385	390	395		
tat ccc cca gac att tat gtg gag tgg cag atg aac ggg cag cca cag				1251
Tyr Pro Pro Asp Ile Tyr Val Glu Trp Gln Met Asn Gly Gln Pro Gln				
400	405	410		
gaa aac tac aag aac act cca cct acg atg gac aca gat ggg agt tac				1299
Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Thr Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr				



415	420	425	
ttc ctc tac agc aag ctc aat gtg aag aag gaa aaa tgg cag cag gga			1347
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Asn Val Lys Lys Glu Lys Trp Gln Gln Gly			
430	435	440	445
aac acg ttc acg tgt tot gtg ctg cat gaa ggc ctg cac aac cac cat			1395
Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His			
450	455	460	
act gag aag agt ctc tcc cac tct ccg ggt aaa gcc caa gat ttt gtg			1443
Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys Ala Gln Asp Phe Val			
465	470	475	
cag tgg ttg atg aat acc tgagaattct			1471
Gln Trp Leu Met Asn Thr			
480			

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 4790

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; DNA sequence of artificial expression vector pCAGGS

&lt;400&gt; 3

gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata	60
gcccataatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgctt ggctgaccgc	120
ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag	180
ggactttcoa ttgacgtoaa tgggtggact atttacggta aactgcccac ttggcagtac	240
atcaagtgta tcatatgcc aatacgcgcc ctattgacgt caatgacggt aaatggcccg	300

cctggcatta tgcccagtac atgaacctat gggactttcc tacttggcag tacatctacg 360  
tattagtcat cgtattacc atgggtcgag gtgagcccca cgttctgctt cactctcccc 420  
atctcccccc cctccccacc cccaattttg tatttattta tttttaatt attttgtgca 480  
gcgatggggg cggggggggg gggggcgcg cccaggcggg gcggggcggg gcgagggggc 540  
gggcggggcg aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcg tccgaaagtt 600  
tccttttatg gcgagggcg gcggcgggcg gccctataaa aagcgaagcg gcggcgggcg 660  
gggagtcgct ggtttgcctt cggcccgctg cccgctcgc gccgcctgc gccgcccgcc 720  
ccggctctga ctgaccgct tactccaca ggtgagcggg cgggacggcc cttctctcc 780  
gggctgtaat tagcgcttg tttaatgac gctcgtttct tttctgtggc tgcgtgaaag 840  
ccttaaaggg ctccgggagg gccctttgtg cgggggggag cggctcgggg ggtgcgtgcg 900  
tgtgtgtgtg cgtggggagc gccgcgtgc gccgcgctg cccggcggct gtgagcgtg 960  
cgggcgcggc gcggggcctt gtgcgctcgc cgtgtgcgc aggggagcgc ggccgggggc 1020  
ggtgccccgc ggtgcggggg ggctgcgagg ggaacaaagg ctgcgtcgg ggtgtgtgcg 1080  
tggggggtg agcagggggt gtgggcggc cggtcgggct gtaaccccc cctgcacccc 1140  
cctccccgag ttgtgagca cggcccggt tcgggtcgg ggctcgtgc ggggcgtggc 1200  
gcggggctgc cgtgccggg cggggggtg cggcaggtg ggtgccggg cggggcgggg 1260  
ccgcctcgg cgggggagg ctgggggag gggcgcgcg gccccggag gccggcggct 1320  
gtcagggcgc gcgagccgc agccattgcc ttttatggta atcgtgcgag agggcgcagg 1380

gacttccttt gtcccaaatac tggcggagcc gaaatctggg aggcgcgcgc gcacccctc 1440

tagcgggcgc gggogaagcg gtgcggcgcc ggcaggaagg aaatgggcgg ggagggcctt 1500

cgtgcgtcgc cgcgcgcgcg tccccttctc catctccagc ctccgggctg ccgcaggggg 1560

acggctgcct tgggggggga cggggcaggg cggggttcgg cttctggcgt gtgaccggcg 1620

gctctagagc ctctgctaac catgttcatt cttcttctt tttctacag ctctgggca 1680

acgtgctggt tgttgtctg tctcatcatt ttggcaaaga attctogag gaattcactc 1740

ctcaggtgca ggctgcctat cagaaggtagg tggctgggtg ggccaatgcc ctggctcaca 1800

aataccactg agatcttttt ccctctgcca aaaattatgg ggacatcatg aagccccttg 1860

agcatctgac ttctggctaa taaaggaaat ttattttcat tgcaatagtg tgttggaatt 1920

tttgtgtct ctcactcgga aggacatatg ggagggcaaa tcatttaaaa catcagaatg 1980

agtatttgggt ttagagtttg gcaacatatg ccatatgctg gctgcatga acaaaggtagg 2040

ctataaagag gtcacagta tatgaaacag cccctgctg tccattcctt attocataga 2100

aaagccttga cttgaggtta gatttttttt atattttgtt ttgtgttatt tttttcttta 2160

acatccctaa aattttcctt acatgtttta ctagccagat ttttctcct ctctgacta 2220

ctcccagtoa tagctgtccc tcttctotta tgaagatccc togacctgca gcccaagctt 2280

ggcgtaatca tggcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca 2340

caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctggggg gcctaagtag tgagctaaact 2400

cacattaatt gcgttgcgt cactgcccgc tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagcg 2460

gatccgcac tcaattagtc agcaaccata gtcccgcccc taactccgcc catcccgccc 2520  
ctaactccgc ccagttccgc ccattctcgc ccccatggct gactaatttt ttttatttat 2580  
gcagaggcgc aggccgcctc ggctctgag ctattccaga agtagtgagg aggctttttt 2640  
ggaggcctag gcttttgcaa aaagctaact tgtttattgc agcttataat ggttacaaat 2700  
aaagcaatag catcacaaat ttcacaaata aagcattttt ttcactgcat tctagttgtg 2760  
gtttgtocaa actcatcaat gtatcttato atgtctggat ccgctgcatt aatgaatogg 2820  
ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat tgggcgctct tccgcttctt cgctcactga 2880  
ctcgtcgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg agcggatatca gctcactcaa aggcggtaat 2940  
acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca 3000  
aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc 3060  
tgacgagcat cacaaaaatc gacgtcaag tcagagggtg cgaaaccoga caggactata 3120  
aagataccag gogtttcccc ctggaagctc cctcgtgogc tctcctgttc cgaccctgcc 3180  
gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc ttcggaagc gtggcgcttt ctcaatgctc 3240  
acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga 3300  
acccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc 3360  
ggtaaacac gacttatogc cactggcagc agccactggg aacaggatta gcagagcgag 3420  
gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtgggtgcct aactacggct acactagaag 3480  
gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttoggaaaaa gatttggtag 3540

ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagogggtgt tttttgttt gcaagcagca 3600  
gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttota cgggggtctga 3660  
cgctcagtg aaogaaaact cacgttaagg gatittggtc atgagattat caaaaaggat 3720  
cttcacctag atocttttaa attaaaaatg aagttttaa tcaatctaaa gtatatatga 3780  
gtaaacttgg totgacagtt accaatgctt aatcagtgag gcacotatct cagcgatctg 3840  
totatttctg tcatccatag ttgcctgact ccccgctgtg tagataacta cgatacggga 3900  
gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgoga gacccacgt caccggctcc 3960  
agatttatca gcaataaacc agccagccgg aaggggcggag cgcagaagt gtcttgcaac 4020  
tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgcgggaa gctagagtaa gtagttcgcc 4080  
agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgotacaggc atcgtggtgt caccgtcgtc 4140  
gtttggtatg gcttcattca gtcgcggttc ccaacgatca aggcgagta catgatcccc 4200  
catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt cggctctcgg atcgttgtca gaagtaagtt 4260  
ggcgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctotta ctgtcatgcc 4320  
atccgtaaga tgcttttctg tgaactgtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg 4380  
tatgoggcga ccgagttgct cttgccgggc gtcaatacgg gataataccg cgccacatag 4440  
cagaacttta aaagtgtca tcattggaac acgttcttgg gggcgaaaac tctcaaggat 4500  
cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcacccaact gatottcagc 4560  
atottttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa atgcgcgaaa 4620

aaaggaata agggcgacac ggaaatgttg aatactoata ctottccttt ttcaatatta 4680

ttgaagcatt tatcagggtt attgtotoat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa 4740

aaataaacia ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa gtgccacctg 4790

<210> 4

<211> 1233

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (13).. (1224)

<223> DNA insert encoding rat CTLA4, rat IgG Fc region and glucagon C19-29 region

<400> 4

gaattcatTT aa atg gct tgt ctt gga ctc cag agg tac aaa act cac ctg 51

Met Ala Cys Leu Gly Leu Gln Arg Tyr Lys Thr His Leu

1

5

10

cag ctg cct tct agg act tgg cct ttt gga gtc ctg ctt tot ctt ctc 99

Gln Leu Pro Ser Arg Thr Trp Pro Phe Gly Val Leu Leu Ser Leu Leu

15

20

25

tto atc cca atc tto tct gaa gcc ata caa gtg acc caa oct tca gtg 147

Phe Ile Pro Ile Phe Ser Glu Ala Ile Gln Val Thr Gln Pro Ser Val

30

35

40

45

gtg ttg gcc agc agc cac ggt gtc gcc agc ttt oca tgt gaa tat gca 195

Val Leu Ala Ser Ser His Gly Val Ala Ser Phe Pro Cys Glu Tyr Ala

50

55

60

tct tca cac aac act gat gag gtc cgg gtg acg gtg ctg ogg cag aca 243

Ser Ser His Asn Thr Asp Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Thr

65	70	75	
aat gac caa gtg aca gag gtc tgt gcc acg aca ttc aca gtg aag aac			291
Asn Asp Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Thr Thr Phe Thr Val Lys Asn			
80	85	90	
acg ttg ggc ttc cta gat gac ccc ttc tgc agt ggt acc ttt aat gaa			339
Thr Leu Gly Phe Leu Asp Asp Pro Phe Cys Ser Gly Thr Phe Asn Glu			
95	100	105	
agc aga gtg aac ctc acc atc caa gga ctg agg gct gct gac acc gga			387
Ser Arg Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly			
110	115	120	125
ctg tac ttc tgc aag gtg gaa ctc atg tac cca ccg cca tac ttt gtg			435
Leu Tyr Phe Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Phe Val			
130	135	140	
ggc atg ggc aac ggg acc cag att tat gtc atc gat cca gaa cca tgc			483
Gly Met Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys			
145	150	155	
cca gat tca gac gcg gcc gcc gtg ccc aga aac tgt gga ggt gat tgc			531
Pro Asp Ser Asp Ala Ala Ala Val Pro Arg Asn Cys Gly Gly Asp Cys			
160	165	170	
aag cct tgt ata tgt aca ggc tca gaa gta tca tot gtc ttc atc ttc			579
Lys Pro Cys Ile Cys Thr Gly Ser Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe			
175	180	185	
ccc cca aag ccc aaa gat gtg ctc acc atc act ctg act cct aag gtc			627
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val			
190	195	200	205
acg tgt gtt gtg gta gac att agc cag gac gat ccc gag gtc cat ttc			675
Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val His Phe			

210	215	220	
agc tgg ttt gta gat gac gtg gaa gtc cac aca gct cag act cga cca			723
Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Arg Pro			
225	230	235	
cca gag gag cag ttc aac agc act ttc cgc tca gtc agt gaa ctc ccc			771
Pro Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro			
240	245	250	
atc ctg cac cag gac tgg ctc aat ggc agg acg ttc aga tgc aag gtc			819
Ile Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Arg Thr Phe Arg Cys Lys Val			
255	260	265	
acc agt goa gct ttc cca tcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa ccc			867
Thr Ser Ala Ala Phe Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Pro			
270	275	280	285
gaa ggc aga aca caa gtt cgc cat gta tac acc atg tca cct acc aag			915
Glu Gly Arg Thr Gln Val Pro His Val Tyr Thr Met Ser Pro Thr Lys			
290	295	300	
gaa gag atg acc cag aat gaa gtc agt atc acc tgc atg gta aaa ggc			963
Glu Glu Met Thr Gln Asn Glu Val Ser Ile Thr Cys Met Val Lys Gly			
305	310	315	
ttc tat ccc cca gac att tat gtg gag tgg cag atg aac ggg cag cca			1011
Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Tyr Val Glu Trp Gln Met Asn Gly Gln Pro			
320	325	330	
cag gaa aac tac aag aac act cca cct acg atg gac aca gat ggg agt			1059
Gln Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Thr Met Asp Thr Asp Gly Ser			
335	340	345	
tac ttc ctc tac agc aag ctc aat gtg aag aag gaa aaa tgg cag cag			1107
Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Asn Val Lys Lys Glu Lys Trp Gln Gln			



350                      355                      360                      365  
 gga aac acg ttc acg tgt tct gtg ctg cat gaa ggc ctg cac aac cac      1155  
 Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His  
                          370                      375                      380  
 cat act gag aag agt ctc tcc cac tct cgg ggt aaa gcc caa gat ttt      1203  
 His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys Ala Gln Asp Phe  
                          385                      390                      395  
 gtg cag tgg ttg atg aat acc tgagaattc      1233  
 Val Gln Trp Leu Met Asn Thr  
                          400

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 1143

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (13).. (1134)

&lt;223&gt; DNA insert encoding rat IL13, rat IgG Fc region and glucagon C19-29 region

&lt;400&gt; 5

gaattcattt aa atg gca ctc tgg gtg act gca gtc ctg gct ctc gct tgc      51  
                          Met Ala Leu Trp Val Thr Ala Val Leu Ala Leu Ala Cys  
                          1                      5                      10

ctt ggt ggt ott gcc acc cca ggg cca gtg cgg aga tcc aca tct ccc      99  
 Leu Gly Gly Leu Ala Thr Pro Gly Pro Val Arg Arg Ser Thr Ser Pro  
                          15                      20                      25

cct gtg gcc ctc agg gag ott atc gag gag ctg agc aac atc aca caa      147  
 Pro Val Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu Glu Leu Ser Asn Ile Thr Gln  
 30                      35                      40                      45

gac cag aag act tcc ctg tgc aac agc agc atg gta tgg agc gtg gac	195
Asp Gln Lys Thr Ser Leu Cys Asn Ser Ser Met Val Trp Ser Val Asp	
50 55 60	
ctg aca gct ggc ggg ttc tgt gca gcc ctg gaa tcc ctg acc aac atc	243
Leu Thr Ala Gly Gly Phe Cys Ala Ala Leu Glu Ser Leu Thr Asn Ile	
65 70 75	
tcc agt tgc aat gcc atc cac agg acc cag agg ata ttg aat ggc ctc	291
Ser Ser Cys Asn Ala Ile His Arg Thr Gln Arg Ile Leu Asn Gly Leu	
80 85 90	
tgt aac caa aag gcc tcg gat gtg gct tcc agc ccc cca gat acc aaa	339
Cys Asn Gln Lys Ala Ser Asp Val Ala Ser Ser Pro Pro Asp Thr Lys	
95 100 105	
atc gaa gta gcc cag ttt ata tca aaa ctg ctc aat tac tcc aag caa	387
Ile Glu Val Ala Gln Phe Ile Ser Lys Leu Leu Asn Tyr Ser Lys Gln	
110 115 120 125	
ctt ttc cgc tat ggc cac gcg gcc gcc gtg ccc aga aac tgt gga ggt	435
Leu Phe Arg Tyr Gly His Ala Ala Ala Val Pro Arg Asn Cys Gly Gly	
130 135 140	
gat tgc aag cct tgt ata tgt aca ggc tca gaa gta tca tct gtc ttc	483
Asp Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Gly Ser Glu Val Ser Ser Val Phe	
145 150 155	
atc ttc ccc cca aag ccc aaa gat gtg ctc acc atc act ctg act cct	531
Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro	
160 165 170	
aag gtc acg tgt gtt gtg gta gac att agc cag gac gat ccc gag gtc	579
Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val	
175 180 185	



cag cag gga aac acg ttc acg tgt tot gtg ctg cat gaa ggc ctg cac 1059  
 Gln Gln Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His  
 335 340 345

aac cac cat act gag aag agt ctc tcc cac tct ccg ggt aaa gcc caa 1107  
 Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys Ala Gln  
 350 355 360 365

gat ttt gtg cag tgg ttg atg aat acc tgagaattc 1143  
 Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr  
 370

<210> 6

<211> 825

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (13).. (816)

<223> DNA insert encoding rat signal peptide, rat IgG Fc region and glucagon C19-29 region

<400> 6

gaattcattt aa atg aag tcc tgc ggc ctg ttc cct ctc atg gtg ctc ctt 51  
 Met Lys Ser Cys Gly Leu Phe Pro Leu Met Val Leu Leu  
 1 5 10

gct ctg ggt gta ctg gca ccc tgg agt gtg gaa gga gcg gcc gcc gtg 99  
 Ala Leu Gly Val Leu Ala Pro Trp Ser Val Glu Gly Ala Ala Ala Val  
 15 20 25

ccc aga aac tgt gga ggt gat tgc aag cct tgt ata tgt aca ggc tca 147  
 Pro Arg Asn Cys Gly Gly Asp Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Gly Ser  
 30 35 40 45

gaa gta tca tct gtc ttc atc ttc ccc cca aag ccc aaa gat gtg ctc 195  
 Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu  
                   50                  55                  60

acc atc act ctg act cct aag gtc acg tgt gtt gtg gta gac att agc 243  
 Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser  
                   65                  70                  75

cag gac gat ccc gag gtc cat ttc agc tgg ttt gta gat gac gtg gaa 291  
 Gln Asp Asp Pro Glu Val His Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu  
                   80                  85                  90

gtc cac aca gct cag act cga cca cca gag gag cag ttc aac agc act 339  
 Val His Thr Ala Gln Thr Arg Pro Pro Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr  
                   95                  100                  105

ttc cgc tca gtc agt gaa ctc ccc atc ctg cac cag gac tgg ctc aat 387  
 Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
 110                  115                  120                  125

ggc agg acg ttc aga tgc aag gtc acc agt gca gct ttc cca tcc ccc 435  
 Gly Arg Thr Phe Arg Cys Lys Val Thr Ser Ala Ala Phe Pro Ser Pro  
                   130                  135                  140

atc gag aaa acc atc tcc aaa ccc gaa ggc aga aca caa gtt ccg cat 483  
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Pro Glu Gly Arg Thr Gln Val Pro His  
                   145                  150                  155

gta tac acc atg toa cct acc aag gaa gag atg acc cag aat gaa gtc 531  
 Val Tyr Thr Met Ser Pro Thr Lys Glu Glu Met Thr Gln Asn Glu Val  
                   160                  165                  170

agt atc acc tgc atg gta aaa ggc ttc tat ccc cca gac att tat gtg 579  
 Ser Ile Thr Cys Met Val Lys Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Tyr Val  
                   175                  180                  185

gag tgg cag atg aac ggg cag cca cag gaa aac tac aag aac act cca 627  
 Glu Trp Gln Met Asn Gly Gln Pro Gln Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Pro  
 190 195 200 205

cct acg atg gac aca gat ggg agt tac ttc ctc tac agc aag ctc aat 675  
 Pro Thr Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Asn  
 210 215 220

gtg aag aag gaa aaa tgg cag cag gga aac acg ttc acg tgt tct gtg 723  
 Val Lys Lys Glu Lys Trp Gln Gln Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val  
 225 230 235

ctg cat gaa ggc ctg cac aac cac cat act gag aag agt ctc tcc cac 771  
 Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His  
 240 245 250

tot ccg ggt aaa gcc caa gat ttt gtg cag tgg ttg atg aat acc 816  
 Ser Pro Gly Lys Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr  
 255 260 265

tgagaattc 825

<210> 7

<211> 1284

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (13).. (1275)

<223> DNA insert encoding rat IL1 receptor antagonist, rat IgG Fc region and glucagon C19-29 region

<400> 7

gaattcattt aa atg gaa atc tgc tgg gga ccc tac agt cac cta atc tot 51

Met	Glu	Ile	Cys	Trp	Gly	Pro	Tyr	Ser	His	Leu	Ile	Ser				
1				5						10						
ctc	ctt	ctc	atc	ctt	ctg	ttt	cat	tca	gag	gca	gcc	tgc	cgc	cct	tct	99
Leu	Leu	Leu	Ile	Leu	Leu	Phe	His	Ser	Glu	Ala	Ala	Cys	Arg	Pro	Ser	
15				20						25						
ggg	aaa	aga	ccc	tgc	aag	atg	caa	gcc	ttc	aga	atc	tgg	gat	act	aac	147
Gly	Lys	Arg	Pro	Cys	Lys	Met	Gln	Ala	Phe	Arg	Ile	Trp	Asp	Thr	Asn	
30				35					40					45		
cag	aag	acc	ttt	tac	ctg	aga	aac	aac	cag	ctc	att	got	ggg	tac	tta	195
Gln	Lys	Thr	Phe	Tyr	Leu	Arg	Asn	Asn	Gln	Leu	Ile	Ala	Gly	Tyr	Leu	
			50						55					60		
caa	gga	cca	aat	atc	aaa	cta	gaa	gaa	aag	ata	gac	atg	gtg	cct	att	243
Gln	Gly	Pro	Asn	Ile	Lys	Leu	Glu	Glu	Lys	Ile	Asp	Met	Val	Pro	Ile	
		65							70					75		
gac	ctt	cat	agt	gtg	ttc	ttg	ggc	atc	cac	ggg	ggc	aag	ctg	tgc	ctg	291
Asp	Leu	His	Ser	Val	Phe	Leu	Gly	Ile	His	Gly	Gly	Lys	Leu	Cys	Leu	
	80							85						90		
tct	tgt	gcc	aag	tct	gga	gat	gat	atc	aag	ctc	cag	ctg	gag	gaa	gtt	339
Ser	Cys	Ala	Lys	Ser	Gly	Asp	Asp	Ile	Lys	Leu	Gln	Leu	Glu	Glu	Val	
	95							100						105		
aac	atc	act	gat	ctg	agc	aag	aac	aaa	gaa	gaa	gac	aag	cgc	ttt	acc	387
Asn	Ile	Thr	Asp	Leu	Ser	Lys	Asn	Lys	Glu	Glu	Asp	Lys	Arg	Phe	Thr	
110														125		
ttc	atc	cgc	tct	gag	aaa	ggc	ccc	acc	acc	agc	ttt	gag	tca	gct	gcc	435
Phe	Ile	Arg	Ser	Glu	Lys	Gly	Pro	Thr	Thr	Ser	Phe	Glu	Ser	Ala	Ala	
			130											140		
tgt	cca	gga	tgg	ttc	ctc	tgc	aca	aca	cta	gag	gct	gac	cgt	cct	gtg	483

Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Thr Leu Glu Ala Asp Arg Pro Val	
145 150 155	
agc ctc acc aac aca ccg gaa gag ccc ctt ata gtc acg aag ttc tac	531
Ser Leu Thr Asn Thr Pro Glu Glu Pro Leu Ile Val Thr Lys Phe Tyr	
160 165 170	
ttc cag gaa gac caa gcg gcc gcc gtg ccc aga aac tgt gga ggt gat	579
Phe Gln Glu Asp Gln Ala Ala Ala Val Pro Arg Asn Cys Gly Gly Asp	
175 180 185	
tgc aag cct tgt ata tgt aca ggc tca gaa gta tca tct gtc ttc atc	627
Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Gly Ser Glu Val Ser Ser Val Phe Ile	
190 195 200 205	
ttc ccc cca aag ccc aaa gat gtg ctc acc atc act ctg act cct aag	675
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys	
210 215 220	
gtc acg tgt gtt gtg gta gac att agc cag gac gat ccc gag gtc cat	723
Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val His	
225 230 235	
ttc ago tgg ttt gta gat gac gtg gaa gtc cac aca gct cag act cga	771
Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Arg	
240 245 250	
cca cca gag gag cag ttc aac agc act ttc cgc tca gtc agt gaa ctc	819
Pro Pro Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu	
255 260 265	
ccc atc ctg cac cag gac tgg ctc aat ggc agg acg ttc aga tgc aag	867
Pro Ile Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Arg Thr Phe Arg Cys Lys	
270 275 280 285	
gtc acc agt gca gct ttc cca tcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa	915



Val Thr Ser Ala Ala Phe Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys	
290 295 300	
ccc gaa ggc aga aca caa gtt ccg cat gta tac acc atg tca cct acc	963
Pro Glu Gly Arg Thr Gln Val Pro His Val Tyr Thr Met Ser Pro Thr	
305 310 315	
aag gaa gag atg acc cag aat gaa gtc agt atc acc tgc atg gta aaa	1011
Lys Glu Glu Met Thr Gln Asn Glu Val Ser Ile Thr Cys Met Val Lys	
320 325 330	
ggc ttc tat ccc cca gac att tat gtg gag tgg cag atg aac ggg cag	1059
Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Tyr Val Glu Trp Gln Met Asn Gly Gln	
335 340 345	
cca cag gaa aac tac aag aac act cca cct acg atg gac aca gat ggg	1107
Pro Gln Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Thr Met Asp Thr Asp Gly	
350 355 360 365	
agt tac ttc ctc tac agc aag ctc aat gtg aag aag gaa aaa tgg cag	1155
Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Asn Val Lys Lys Glu Lys Trp Gln	
370 375 380	
cag gga aac acg ttc acg tgt tct gtg ctg cat gaa ggc ctg cac aac	1203
Gln Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn	
385 390 395	
cac cat act gag aag agt ctc tcc cac tot ccg ggt aaa gcc caa gat	1251
His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys Ala Gln Asp	
400 405 410	
ttt gtg cag tgg ttg atg aat acc tgagaatto	1284
Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr	
415 420	

<210> 8  
 <211> 369  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (13).. (360)  
 <223> DNA insert encoding human IL8 and glucagon C19-29 region

<400> 8  
 gaattcattt aa atg act tcc aag ctg gcc gtg got ctc ttg gca gcc ttc 51  
                   Met Thr Ser Lys Leu Ala Val Ala Leu Leu Ala Ala Phe  
                   1                  5                  10  
  
 ctg att tct gca got ctg tgt gaa ggt gca gtt ttg cca agg agt got 99  
 Leu Ile Ser Ala Ala Leu Cys Glu Gly Ala Val Leu Pro Arg Ser Ala  
           15                  20                  25  
  
 aaa gaa ctt aga tgt cag tgc ata aag aca tac tcc aaa cct ttc cac 147  
 Lys Glu Leu Arg Cys Gln Cys Ile Lys Thr Tyr Ser Lys Pro Phe His  
   30                  35                  40                  45  
  
 occ aaa ttt atc aaa gaa ctg aga gtg att gag agt gga cca cac tgc 195  
 Pro Lys Phe Ile Lys Glu Leu Arg Val Ile Glu Ser Gly Pro His Cys  
                   50                  55                  60  
  
 gcc aac aca gaa att att gta aag ctt tct gat gga aga gag ctc tgt 243  
 Ala Asn Thr Glu Ile Ile Val Lys Leu Ser Asp Gly Arg Glu Leu Cys  
           65                  70                  75  
  
 ctg gac ccc aag gaa aac tgg gtg cag agg gtt gtg gag aag ttt ttg 291  
 Leu Asp Pro Lys Glu Asn Trp Val Gln Arg Val Val Glu Lys Phe Leu  
           80                  85                  90  
  
 aag agg gct gag aat tca gcg gcc gcc cgg ggt aaa gcc caa gat ttt 339

Lys Arg Ala Glu Asn Ser Ala Ala Ala Pro Gly Lys Ala Gln Asp Phe  
95 100 105

gtg cag tgg ttg atg aat acc tgagaattc 369  
Val Gln Trp Leu Met Asn Thr  
110 115

<210> 9

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector pCAGGS-IgG-glu19-29

<400> 9

gagaattcat ttaaatagaga gggccgcog tgcccagaaa ctgtg 45

<210> 10

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector pCAGGS-IgG-glu19-29

<400> 10

tcaaccactg cacaaaatct tgggctttac ccggagagtg ggagagact 49

<210> 11

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector pCAGGS-IgG-glu19-29

<400> 11

gagaattcat ttaaattgaga gcggccgccg tgcccagaaa ctgtg

45

<210> 12

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector pCAGGS-IgG-glu19-29

<400> 12

gagagagaga attctcaggt attcatcaac cactgcacaa aatcttgggc

50

<210> 13

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector  
pCAGGS-IFN-rR-IgG-glu19-29

<400> 13

gagaattcat ttaaattgatt ctgctggtgg tcctgatg

38

<210> 14

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector  
pCAGGS-IFN-rR-IgG-glu19-29

<400> 14

gcagcatcgc ggcgcgttct tctctgtcat catggagaaa

40

<210> 15

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector  
pCAGGS-CTLA4-IgG-glu19-29

<400> 15

gagaattcat ttaaattggct tgtcttggac tccagagg

38

<210> 16

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector  
pCAGGS-CTLA4-IgG-glu19-29

<400> 16

gcagcatcgc ggcgcgtctt gaattctgggc atggttcttg

40

<210> 17

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector  
pCAGGS-IL13-IgG-glu19-29

<400> 17

gagaattcat ttaaattggca ctctgggtga ctgcagtc

38

<210> 18

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector  
pCAGGS-IL13-IgG-glu19-29

<400> 18

gcagcatcgc ggccgcgtgg ccatagcgga aaagttgctt

40

<210> 19

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector  
pCAGGS-IL1RA-IgG-glu19-29

<400> 19

gagaattcat ttaaattggaa atctgctggg gaccctac

38

<210> 20

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector  
pCAGGS-IL1RA-IgG-glu19-29

<400> 20

gcagcatcgc ggccgcttgg tcttcctgga agtagaactt 40

<210> 21

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector pCAGGS-glu19-29

<400> 21

gagaattcat ttaaattgaga gggccgccc ogggtaaagc ccaagatttt gtgcagtgg 60  
tg 62

<210> 22

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector pCAGGS-glu19-29

<400> 22

gagagagaga attctcaggt attcatcaac caatgcacaa aatcttgggc 50

<210> 23

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector pCAGGS-IL8-glu19-29

<400> 23

gagaattcat ttaaattgact tccaagctgg ccgtggct 38

<210> 24

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer used for constructing a vector pCAGGS-IL8-glu19-29

<400> 24

gcagcatcgc ggccgctgaa ttctcagccc tottcaaaaa

40



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16956

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K48/00, 38/02, 31/7088, A61P43/00, G01N33/53, C12N15/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K48/00, 38/02, 31/7088, A61P43/00, G01N33/53, C12N15/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
MEDLINE, CAPLUS, EMBASE, BIOSIS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Naylor LH. 'Reporter gene technology: the future looks bright.', Biochem.Pharmacol., 01 September, 1999 (01.09.99), 58(5), 749-57	1-12,15,16
A	EP 0009147 A2 (Takeda Yakuhin Kogyo Kabushiki Kaisha), 02 April, 1980 (02.04.80), Full text & JP 55-39702 A	1-12,15,16
A	GB 2002387 A (Takeda Chemical Industries Ltd.), 21 February, 1978 (21.02.78), Full text & US 4206199 A & JP 54-24868 A	1-12,15,16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
05 March, 2004 (05.03.04)

Date of mailing of the international search report  
23 March, 2004 (23.03.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16956

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 13, 14

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 13, 14 pertain to diagnostic methods to be practiced on the human body and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K48/00, 38/02, 31/7088, A61P43/00, G01N33/53, C12N15/16

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K48/00, 38/02, 31/7088, A61P43/00, G01N33/53, C12N15/16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE CAPLUS EMBASE BIOSIS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Naylor LH. 'Reporter gene technology: the future looks bright.' Biochem Pharmacol. 1999 Sep 1, 58(5), 749-57.	1-12, 15, 16
A	EP 0009147 A2 (Takeda Yakuhin Kogyo Kabushiki Kaisha) 1980.04.02, 全文 & JP 55-39702 A	1-12, 15, 16
A	GB 2002387 A (Takeda Chemical Industries Ltd.) 1978.02.21, 全文 & US 4206199 A & JP 54-24868 A	1-12, 15, 16

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05.03.2004

国際調査報告の発送日

23.3.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

川口 裕美子

4C

9829

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

**第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1 ページの2の続き）**

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 13, 14 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。

請求の範囲13, 14は、人体の診断方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であって P C T 規則6. 4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。